

[文章编号] 1007-3949(2011)19-08-0665-03

· 实验研究 ·

## 三碘甲状腺原氨酸对缺血再灌注损伤后未成熟心肌细胞中 Bax、Bcl-2的影响

雷伟程, 徐建军

(南昌大学第二附属医院心胸外科, 江西省南昌市 330006)

[关键词] 三碘甲状腺原氨酸; 缺氧复氧; Bcl-2/Bax

[摘要] 目的 通过三碘甲状腺原氨酸对缺血再灌注损伤后未成熟心肌细胞中 Bax、Bcl-2表达的影响, 探讨其作用机制。方法 培养原代乳鼠未成熟心肌细胞, 通过缺氧复氧建立乳鼠心肌细胞缺血再灌注模型。于缺氧复氧前期给予三碘甲状腺原氨酸处理, 通过聚合酶链反应仪检测三碘甲状腺原氨酸干预后心肌细胞的 Bax mRNA 和 Bcl-2 mRNA 表达情况。结果 缺氧复氧前短期给予三碘甲状腺原氨酸可下调乳鼠未成熟心肌细胞 Bax 的表达, 上调 Bcl-2 的表达, 减少心肌细胞凋亡。结论 三碘甲状腺原氨酸可以提高未成熟心肌抗缺血再灌注损伤的能力, 而对心肌细胞凋亡这种保护作用与心肌细胞 Bcl-2 和 Bax 的表达相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### The Effects of Triiodothyronine on the Bax and Bcl-2 of Immature Cardiocytes while Given Ischemical Reperfusion Injury

LEI Wei-Cheng and XU Jian-Jun

(Cardiothoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006 China)

[KEY WORDS] Triiodothyronine; Anoxia-reoxygenation; Bcl-2/Bax

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of triiodothyronine on the Bax and Bcl-2 of immature cardiocytes while given ischemical reperfusion injury. **Methods** The cardiocytes of neonate rat were cultured in vitro and the ischemical reperfusion injury of cardiocytes were induced by anoxia-reoxygenation. Triiodothyronine ( $T_3$ ) was administered before anoxia-reoxygenation at a concentration of 1  $\mu\text{g/L}$ . Bcl-2 mRNA and Bax mRNA were detected by polymerase chain reaction (PCR). **Results** The Bcl-2 were down-regulated and Bax were up-regulated while given  $T_3$  shortly before anoxia-reoxygenation. At the same time, the apoptosis of cardiocytes were reduced. **Conclusions** Giving triiodothyronine before anoxia-reoxygenation would enhance the ability of immature cardiocytes against ischemical reperfusion injury, and could reduce the apoptosis of cardiocytes. This effect was associated with the expression of Bcl-2 and Bax.

心肌缺血再灌注损伤机制和心肌保护措施的研究取得了很大的进展, 并促进了心血管外科的发展。我国先天性心脏病是 1 岁以下婴儿的主要死因, 发病率约占全部活产婴儿的 0.7%<sup>[1]</sup>。尤其是缺氧紫绀型心脏病, 即使已成功地做了畸形矫治手术, 但术后仍出现心功能不全, 手术死亡率较高。近年来, 随着心脏外科的发展, 婴幼儿体外循环心脏手术明显增多, 手术的复杂程度和危重患者也明显增加, 在手

术流程相对成熟稳定时, 对未成熟心肌细胞的保护要求也越来越高。Bull 等指出, 至少一半的死亡原因应归咎于不恰当的心肌保护<sup>[2-4]</sup>。因此, 寻找有效的药理性干预方式对抗未成熟心肌缺血损伤, 对于提高婴幼儿体外循环心脏手术的疗效具有非常重要的作用。

低水平甲状腺素被认为与病人重症监护期间的短期死亡率和心脏疾病的长期死亡率密切相关<sup>[5]</sup>。在临床心脏移植手术中, 甲状腺素已被用于提高供心的质量、心脏移植的成功率和降低死亡率<sup>[6]</sup>。在离体缺血再灌注心脏研究中, 已发现用三碘甲状腺原氨酸 (triiodothyronine,  $T_3$ ) 药理性预处理可以保护缺血再灌注心脏, 本研究通过观察  $T_3$  对缺血再灌注损伤后未成熟心肌细胞中 Bax、Bcl-2 的影响, 探

[收稿日期] 2011-03-10

[作者简介] 雷伟程, 主治医师, 研究方向为食管癌贲门癌、肺癌、纵隔肿瘤、重症肌无力和胸外伤等, E-mail 为 leiweichen112@163.com。通讯作者徐建军, 教授, 主任医师, E-mail 为 xujianj0791@126.com。

讨其可能的心肌保护作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、药物与试剂

出生 12~72 h 的健康 Sprague-Dawley 乳鼠 180 只,由南昌大学实验动物科学部提供。三碘甲状腺原氨酸 (Sigma 公司, USA)、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 高糖培养基 (Gibco 公司, USA)、胎牛血清 (杭州四季青生物材料有限公司)。聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物序列: Bax 上游 GACACCTGAGCTGACCTTGG, 下游 GAGAAGTCCAGT-GTCCAGG; Bcl-2 上游 GCTACGAGTGGGATACTGGA-GA, 下游 AGTCATCCACAGAGCGATGTT (上海生物工程技术服务公司)。

### 1.2 模型的制备与分组

称重后随机将大鼠分成 3 组, 每组 36 只。包括正常组 (阴性对照组)、缺氧复氧培养组和 T<sub>3</sub> 处理组。脱臼处死乳鼠, 剪开胸骨剑突下稍左侧的皮肤, 打开胸腔, 取出心脏, 置于预温的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 中漂洗 3 次, 剪碎心室肌, 用 0.125% 胰酶消化, 每次 5 min, 共 12~18 次。收集除第 1 次以外的上清, 转入温箱中消化, 每隔 1 h 振荡 1 次。待组织块基本消失时, 将消化后的细胞悬液以 1 000 r/min 离心 5 min, 用含 15% 胎牛血清的高糖 DMEM 吹散细胞, 吸至培养瓶中, 加入 15% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基 6~8 mL, 静置于 37℃、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 5 天。培养 5 天后提取成功的标准为: 形态学上体积小, 心肌原纤维少, 排列无序, 横管系统不发达, 细胞含水量高; 电生理学观察法检查心肌细胞搏动频率大于 90 次/min, 电压钳实验, 细胞的静息电位在  $-80 \pm 7$  mV, 动作电位幅值在  $96 \pm 5$  mV。取培养成功的心肌细胞 3~5 mg 分别加入对应预处理试剂, 不处理或不足的以 0.9% 生理盐水补足, 实验组 1 仅加入 0.9% 生理盐水以使得反应总容积为 250  $\mu$ L, 且不进行缺氧复氧实验; 实验组 2 加入 0.9% 生理盐水以使得反应总容积为 250  $\mu$ L, 且随后进行缺氧复氧实验; 实验组 3 加入 8  $\mu$ mol/L 的 T<sub>3</sub> 溶液<sup>[7]</sup> 以使得反应总容积为 250  $\mu$ L, 且随后进行缺氧复氧实验, 行各项预处理并检查心肌搏动频率情况仍正常后进行缺氧复氧培养。37℃ 预热置的缺氧液和复氧液, 将培养的心肌细胞换用有预充 95% N<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> 的缺氧液, 95% N<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> 的密闭容器中培养 3 h, 再将缺氧的心肌细胞换用预充 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> 的

含糖复氧液, 并在 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> 的密闭容器中培养 2 h, 近似建立缺氧损伤模型。

### 1.3 指标检测

乳鼠心肌细胞总 RNA 的提取: 取心肌细胞悬液 0.1 mL, 加入 0.6 mL TrizolIM reagent 吹打混匀, 室温孵育 5 min 以使核蛋白体完全分离, 再加入 0.2 mL 氯仿, 混匀 1 min, 置于冰上冰浴 10 min, 吸入清洁、预冷的 1.5 mL EP 管, 混匀, 离心 (12 000 r/min, 4℃) 10 min, 小心吸取上层无色水相入另一 EP 管中, 加等体积预冷的异丙醇, 充分混匀, 室温孵育 10 min, 离心 (12 000 r/min, 4℃) 15 min, 弃上清, 用 0.5 mL 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水现配的 75% 酒精洗涤 3 次, 倾去酒精, 倒置 EP 管, 干燥至酒精挥发, 加适量的 DEPC 水, 56℃ 水浴 10 min 后 -70℃ 冷冻备用。总 RNA 的质量、浓度检测与标化: 在分光光度计上用 0.1% DEPC 水调零, 取 2  $\mu$ L RNA 样品, 加 98  $\mu$ L 浓度为 0.1% DEPC 水稀释 50 倍, 分别测 RNA 样品在 260、280 nm 波长的 OD 值, OD 260 nm /OD 280 nm 比值为 1.8~2.0 说明 RNA 纯度较高。取 5~10  $\mu$ L RNA 进行变性琼脂糖电泳, 电泳条件 100 V  $\times$  20 min, 紫外灯下观察看是否存在两条清晰的条带, 以 RNA 浓度最低者对所有样本进行标化。RNA 逆转录、PCR 扩增、电泳及凝胶成像分析。

### 1.4 统计学方法

定量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用统计软件 SPSS 12.0 进行方差齐性检验, 组间比较用配对资料 *t* 检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

T<sub>3</sub> 对心肌细胞 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 水平表达的影响: 预处理后乳鼠未成熟心肌细胞后, T<sub>3</sub> 组 Bcl-2 mRNA 表达上调, 与缺氧复氧组有统计学意义 ( $P < 0.01$ ; 图 1, 表 1)。预处理后乳鼠未成熟心肌细胞后, T<sub>3</sub> 组 Bax mRNA 表达下调, 与缺氧复氧组有统计学意义 ( $P < 0.01$ ; 图 2, 表 1)。

表 1 预处理后各组的 Bax mRNA 及 Bcl-2 mRNA 相对表达  
Table 1. Bax mRNA and Bcl-2 mRNA relative expression after pretreatment

分 组	Bcl-2	Bax
正常组	0.86 $\pm$ 0.04	0.74 $\pm$ 0.07
缺氧复氧组	0.68 $\pm$ 0.07	0.95 $\pm$ 0.09
T <sub>3</sub> 组	0.87 $\pm$ 0.05	0.81 $\pm$ 0.06

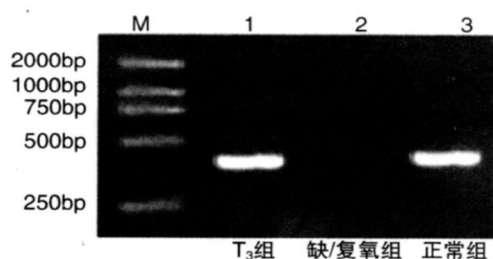


图 1. Bcl-2 mRNA 琼脂糖凝胶电泳

Figure 1. Bcl-2 mRNA agarose gel electrophoresis

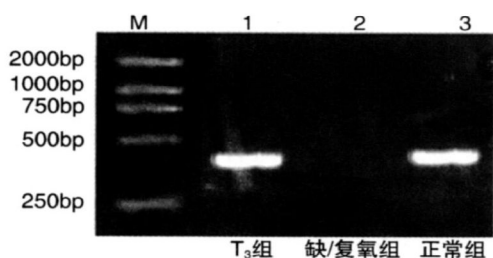


图 2. Bax mRNA 琼脂糖凝胶电泳

Figure 2. Bax mRNA agarose gel electrophoresis

### 3 讨论

既往研究结果认为 Bcl-2 和 Bax 是凋亡调节基因 Bcl-2 家族的两个重要成员,二者可通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡,此二聚体成为细胞死亡信号通路上的分子开关,当 Bcl-2 表达过量时,形成 Bcl-2 同源二聚体和 Bcl-2/Bax 异源二聚体,从而抑制 Bax 促凋亡作用。Bcl-2 多位于线粒体膜、内质网以及外核膜上,而 Bax 蛋白则主要以单体的形式定位于细胞浆中<sup>[8]</sup>。在凋亡信号作用下, Bax 易位并插入线粒体外膜发挥促凋亡活性<sup>[9,10]</sup>,导致细胞凋亡。Bcl-2 能抑制 Bax 从细胞内向线粒体膜上的易位,抑制阻断了线粒体通透性转化孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 开放<sup>[11,12]</sup>。Bcl-2 家族主要是以线粒体为靶器官对细胞进行凋亡调控, Bcl-2 和 Bax 调节凋亡的机制与线粒体内信号传递系统、Bax 转位有密切关系。

在很多刺激因素诱导细胞凋亡的过程中,线粒体膜电位降低,膜的渗透性转运 (permeability transition, PT) 能力增加,活性氧自由基生成增加,  $Ca^{2+}$  释放。同时,细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 及凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor AIF) 从线粒体释放入胞浆,促进蛋白水解及 Caspase 的激活,从而导致细胞凋亡。Bcl-2 可抑制线粒体膜电位的降低、Cyt C 和 AIF 的释放及 Caspase 的激活从而抑制凋亡;而 Bax 正好相反。Bax 的  $\alpha 5$ - $\alpha 6$  形成的双歧性发夹结构,参与了线粒体膜的插入及连接线粒体内膜和外膜的 PT 孔的形成, Bax 直接作用于 PT 孔,使 PT 孔开放,引起线粒体肿胀破坏,使存在于内外膜间隙的 Cyt C 游离出来,导致心肌细胞凋

亡。但也有研究表明, Bax 可直接诱导 Cyt C 释放。Bax 主要存在于细胞质中,细胞发生凋亡时, Bax 重新分布,其作用模式可能是:凋亡诱导信号  $\rightarrow$  细胞质 Bax 的构象改变  $\rightarrow$  Bax 向线粒体转位  $\rightarrow$  Bax 形成二聚体  $\rightarrow$  PT 孔打开  $\rightarrow$  Cyt C 和 AIF 释放  $\rightarrow$  细胞凋亡。Bcl-2 通过异源二聚体的形成抑制 Bax 的转位及 Bax 二聚体的形成。

本实验结果表明,  $T_3$  可以上调缺氧复氧心肌细胞 Bcl-2 表达,下调 Bax 的表达,说明  $T_3$  可以通过影响 Bcl-2 与 Bax 蛋白的表达最终减少缺氧复氧未成熟心肌细胞凋亡;符合相关研究。缺血再灌注损伤是体外循环心肌缺血恢复血供所造成的一个常见的病理生理过程,细胞凋亡是心肌细胞的一种程序性死亡。相关研究显示,凋亡因子 Bcl-2 和 Bax 的相互作用是细胞凋亡的调控中心,并调控未成熟心肌细胞凋亡。 $T_3$  可以提高未成熟心肌抗缺血再灌注损伤的能力,对心肌细胞凋亡起保护作用,进一步明确其在心肌缺血再灌注损伤中的作用及其机制,具有深远的理论意义和临床应用前景。

#### [参考文献]

- [1] Hoffman JJ, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease [J]. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(12): 1890-900
- [2] Bull C, Cooper J, Stark J. Cardioplegic protection of the child's heart [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1984; 88(2): 287-293
- [3] 冯耀光, 胡建国. St. Thomas NO. 2 停跳液与含血心肌停跳液对未成熟兔心肌的保护作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004; 12(1): 47-50
- [4] 唐浩, 周新民, 胡建国, 等. T 型钙通道拮抗剂对未成熟心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005; 13(4): 435-438
- [5] Nicolas Rodondi, Drahomir Aujjsky, Eric Vittinghoff et al. Subclinical hypothyroidism and the risk of coronary heart disease: a meta-analysis [J]. *The American Journal of Medicine* 2006; 119(7): 541-551
- [6] Votavka YV, Canvasser DA, Pennronine DG, et al. Effect of triiodothyronine on graft function in a model of heart transplantation [J]. *Ann Thorac Surg* 1996; 62(1): 78-82
- [7] Protman MA, Qian K, Kneeger J et al. Direct action of  $T_3$  on phosphorylation potential in the sheep heart in vivo [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288(5): 2484-490
- [8] Schindler CK, Shinoda S, Simon RP, et al. Subcellular distribution of Bcl-2 family proteins and 14-3-3 within the hippocampus during seizure-induced neuronal death in the rat [J]. *Neurosci Lett* 2004; 356(3): 163-166
- [9] Gross A, McDonnell M, Korsmeyer SE. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis [J]. *Genes Dev* 1999; 13(15): 1899-911
- [10] Buralac A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins [J]. *J Cell Mol Med* 2003; 7(3): 249-257
- [11] Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res* 2009; 15(4): 1126-132
- [12] 付永峰, 樊体俊. Bcl-2 家族蛋白与细胞凋亡 [J]. *生物化学与生物物理学报*, 2002; 34(4): 389-394

(此文编辑 曾学清)