

神经型一氧化氮合酶在小鼠心肌缺血预处理中的作用

卢晓梅, 张海鹏

(中国医科大学基础医学院病理生理学教研室, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 神经型一氧化氮合酶; 缺血预处理; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 应用神经型一氧化氮合酶(nNOS)基因敲除小鼠和 nNOS 抑制剂,探讨 nNOS 对心肌缺血预处理后心肌细胞凋亡的影响。**方法** 实验分为野生型缺血再灌注组(WT IR)、野生型缺血预处理组(WT IP)、野生型缺血预处理 L-VNIO 处理组(WT IP + L-VNIO)、基因敲除鼠缺血再灌注组(KO IR)和基因敲除鼠缺血预处理组(KO IP)。采用冠状动脉左前降支结扎法建立小鼠缺血再灌注损伤模型,缺血再灌注组缺血 30 min 再灌注 3 h,缺血预处理组分别经缺血 5 min 再灌注 5 min 连续三个循环后,再缺血 30 min 再灌注 3 h,观察 TUNEL 染色和 Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3 的活性变化,并用 Western Blot 法观察 Bax、Bcl-2 和 Fas 蛋白的表达情况。**结果** 与 WT IR 组相比,WT IP 组小鼠 TUNEL 阳性细胞数目减少,Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-3 活性降低,Bax 和 Fas 蛋白表达显著降低,Bcl-2 表达显著增加($P < 0.05$)。而在 KO IP 组,与 KO IR 组相比,TUNEL 阳性细胞数目和 Caspase 活性显著增加,Bax 和 Fas 表达显著增高,Bcl-2 表达显著降低($P < 0.05$)。**结论** nNOS 在心肌缺血预处理时发挥抑制心肌细胞凋亡的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of nNOS During Myocardial Ischemic Preconditioning in Mice

LU Xiao-Mei, and ZHANG Hai-Peng

(Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Neuronal Nitric Oxide Synthase; Ischemic Preconditioning; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** Using neuronal nitric oxide synthase (nNOS) knockout mice and nNOS inhibitor to investigate the effect of nNOS during myocardial ischemic preconditioning. **Methods** Mice were divided into wild-type ischemia-reperfusion group (WT IR), wild-type ischemic preconditioning group (WT IP), wild-type L-VNIO treatment group (WT IP + L-VNIO), nNOS^{-/-} mice ischemia-reperfusion group (KO IR), nNOS^{-/-} mice ischemic preconditioning group (KO IP). They were subjected to 30 minutes of ischemia by left descending branch of coronary artery ligation followed 3 hours reperfusion. IP was induced by 3 cycles of 5 minutes ischemia and reperfusion before 30 minutes ischemia. After 3 hours reperfusion, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining and activities of caspase-8, caspase-9, caspase-3, Bax, Bcl-2 and Fas expression were measured. **Results** In WT group, compared with IR group, TUNEL positive cells, caspase-8, caspase-9, caspase-3 activities and Bax and Fas protein expression were significantly decreased, Bcl-2 expression was significantly increased ($P < 0.05$). In KO group, compared with IR group, TUNEL positive cells, caspase-8, caspase-9, caspase-3 activities and Bax and Fas protein expression were significantly increased, Bcl-2 expression was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** nNOS was involved in myocardial ischemic preconditioning by reducing myocardial apoptosis.

缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)对心肌的保护是迄今为止最强的内源性保护,短暂缺血可以使心肌在后续的延长缺血中得到保护从而限制心肌梗死的范围。国内外诸多学者也已证明冠状动脉多次短暂的缺血可以增强心肌对随后长

时间缺血的耐受性,减轻缺血后心律失常的发生率和严重程度^[1],促进心肌缺血后心脏功能的恢复,缩小心肌梗死的面积,减轻再灌注损伤中的心肌细胞凋亡。一氧化氮合酶通过催化产生 NO 在促进血小板和中性粒细胞黏附聚集、促进自由基产生、调节

[收稿日期] 2011-06-27

[作者简介] 卢晓梅,博士,讲师,主要从事心血管疾病防治的研究,E-mail 为 xmlu@mail.cmu.edu.cn。通讯作者张海鹏,教授,主要从事高压氧治疗疾病的机制研究,E-mail 为 hpzhangsq@yahoo.com.cn。

冠状动脉节律和心肌收缩性方面发挥重要作用。然而一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)在缺血预处理中的作用却颇有争议。研究发现 NOS 的两种亚型 iNOS 和 eNOS 产生的 NO 同时作为触发者和中介,在 IP 的延迟期发挥保护作用^[2,3]。最近的研究发现,在兔 IP 的延迟期末阶段, nNOS 与环氧合酶 2 共同作用发挥保护作用^[4]。然而, nNOS 和 NO 是否参与早期 IP 仍有争议。本研究主要通过观察 nNOS 抑制剂急性给药和 nNOS 基因敲除对心肌缺血预处理后心肌细胞凋亡的影响,观察 nNOS 在心脏缺血预处理时的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

TUNEL 试剂盒(Calbiochem, Darmstadt, Germany); Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 活性试剂盒 (Chemicon International Inc. USA); 抗体 (Cell Signaling Technology, Inc, USA); ECL 发光系统 (ECL kit, Amersham Pharmacia, GE Healthcare, UK); 蛋白测定试剂盒 (Bio-Rad, USA)。

1.2 动物及分组

12 周龄雄性 nNOS 基因敲除 (KO) 鼠和 C57BL/6 小鼠由日本香川大学医学部和中国医科大学实验动物部提供。实验分为野生型缺血再灌注组 (WT IR)、野生型缺血预处理组 (WT IP)、野生型缺血预处理 L-VNIO 处理组 (WT IP + L-VNIO)、基因敲除鼠缺血再灌注组 (KO IR) 和基因敲除鼠缺血预处理组 (KO IP)。每组 10 只。

1.3 小鼠模型制备

动物由苯巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉,呼吸机辅助呼吸。在手术前 30 min,通过颈静脉输注给予 nNOS 抑制剂亚胺基烯丁基-L-鸟氨酸 (L-VNIO, 60 μg/kg)。打开左前胸,暴露心脏。用 7/0 尼龙丝线在左心耳下方 2 mm 处结扎冠状动脉左前降支,解剖显微镜下确认,结扎 30 min 再松开恢复再灌注 3 h。预处理组在再灌注前分别进行缺血 5 min 再灌注 5 min 三个循环的预处理,实验前和再灌注后 24 h,尾部套管法监测清醒状态下小鼠的心率和血压。

1.4 TUNEL 法测定心肌细胞凋亡

OCT 包裹心肌梗死周围组织制成 4 μm 冰冻切片并按 TUNEL 试剂盒要求进行染色,染色后用激光共聚焦扫描显微镜观察结果。每个标本取三片,每片测定十个区域,每个区域计数细胞核的数量以及

TUNEL 阳性细胞数量,并计算 TUNEL 阳性细胞数量占细胞核的比值作为凋亡指数。

1.5 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 活性测定

按照试剂盒说明书要求制备样本,设置反应体系检测 Caspase 酶活性,用酶标仪在 λ = 405 nm 测定其吸光度值。

1.6 Bax、Bcl-2 和 Fas 蛋白的表达

用 Western Blot 法检测 Bax、Bcl-2 和 Fas 蛋白的表达。等量的蛋白 (50 μg) 进行 SDS-PAGE 电泳,电泳毕转移到硝酸纤维素膜上一抗孵育,4℃ 过夜。HRP-二抗孵育 1 h 后显色系统显色。膜脱抗体处理后再用 β-actin 抗体孵育。Western Blot 条带用 NIH Image Software 分析灰度。

1.7 统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 SPSS 11.0 统计学软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本生命体征

在所有的野生型 (WT) 小鼠,体重和心脏重量差异无显著性。年龄匹配的 nNOS 基因敲除小鼠与野生型小鼠相比,体重和心脏重量较轻 ($P < 0.05$)。在清醒的状态下,手术前后收缩压、舒张压和心率差异均无显著性。

2.2 TUNEL 染色结果

在野生型小鼠,与 WT IR 组相比,WT IP 组小鼠 TUNEL 阳性细胞数目显著降低 ($P < 0.05$)。与 WT IP 组相比,L-VNIO 预处理后 TUNEL 阳性细胞数目显著增加 ($P < 0.05$)。在 nNOS 基因敲除小鼠,与 KO IR 组相比,KO IP 组 TUNEL 阳性细胞数目显著增加 ($P < 0.05$; 图 1 和表 1)。

表 1. 各组小鼠心肌组织凋亡指数 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	凋亡指数
WT IR 组	10	14.2% ± 1.1%
WT IP 组	10	4.1% ± 0.8% ^a
WT IP + L-VNIO 组	10	16.4% ± 1.4% ^b
KO IR 组	10	7.5% ± 0.6%
KO IP 组	10	15.1% ± 1.6% ^{bc}

a 为 $P < 0.05$,与 WT IR 组相比;b 为 $P < 0.05$,与 WT IP 组相比;c 为 $P < 0.05$,与 KO IR 组相比。

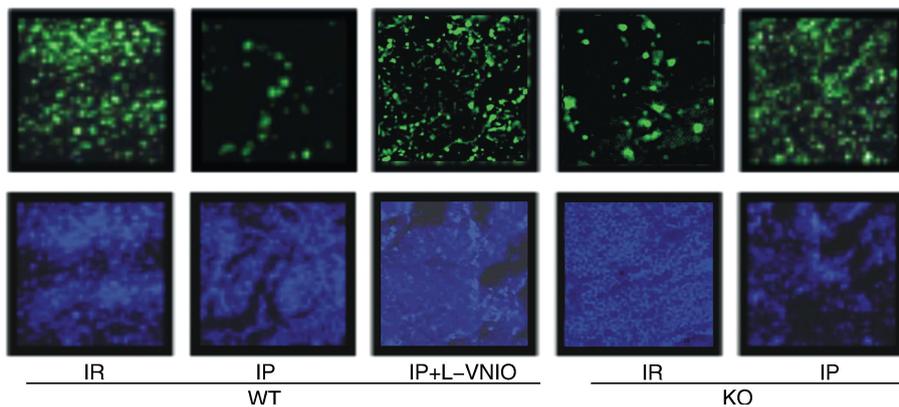


图 1. 心肌细胞 TUNEL 阳性染色结果

Figure 1. TUNEL-positive staining of myocytes

2.3 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 活性测定结果

在野生型小鼠,与 WT IR 组相比,WT IP 组 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 活性显著降低 ($P < 0.05$)。与 WT IP 组相比,L-VNIO 预处理后 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 活性显著增加 ($P < 0.05$)。在 nNOS 基因敲除鼠,与 KO IR 组相比,KO IP 组 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 活性显著增高 ($P < 0.05$;表 2)。

表 2. 各组小鼠心肌组织 Caspases-3、Caspase-8 和 Caspase-9 活性测定结果 ($\bar{x} \pm s$, MU/g)

Table 2 Activities of Caspases-3、Caspase-8 and Caspase-9 in mouse myocardium in each group

分 组	n	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
WT IR 组	10	309 ± 22	269 ± 20	310 ± 23
WT IP 组	10	163 ± 19 ^a	131 ± 18 ^a	178 ± 18 ^a
WT IP + L-VNIO 组	10	320 ± 24 ^b	260 ± 15 ^b	298 ± 14 ^b
KO IR 组	10	257 ± 16	198 ± 17	253 ± 23
KO IP 组	10	321 ± 26 ^{bc}	278 ± 14 ^{bc}	328 ± 20 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$,与 WT IR 组相比;b 为 $P < 0.05$,与 WT IP 组相比;c 为 $P < 0.05$,与 KO IR 组相比。

2.4 Bax、Bcl-2 和 Fas 蛋白的表达

在野生型小鼠,与 WT IR 组相比,WT IP 组小鼠 Bax 和 Fas 蛋白表达显著降低,Bcl-2 表达显著增加 ($P < 0.05$)。与 WT IP 组相比,L-VNIO 预处理后 Bax 和 Fas 蛋白表达显著增加,Bcl-2 表达显著降低 ($P < 0.05$)。在 nNOS 基因敲除鼠,与 KO IR 组相比,KO IP 组 Bax 和 Fas 蛋白表达显著增加,Bcl-2 表达显著降低 ($P < 0.05$;图 2 和表 3)。

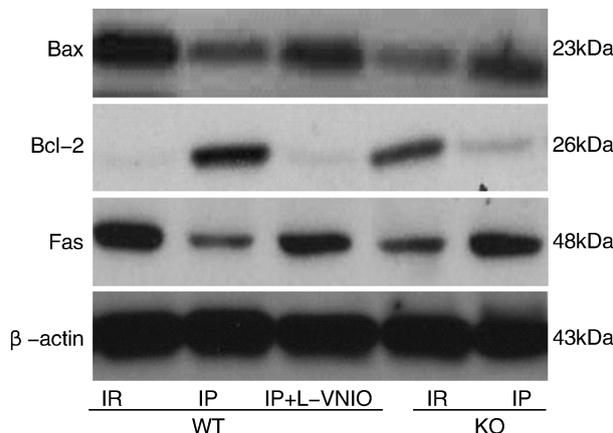


图 2. 各组小鼠心肌组织 Bax、Bcl-2 和 Fas 蛋白的表达

Figure 2. Expression of Bax、Bcl-2 and Fas in mouse myocardium in each group

表 3. 各组小鼠心肌组织 Bax、Bcl-2 和 Fas 蛋白的表达情况 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Table 3. Expression of Bax、Bcl-2 and Fas in mouse myocardium in each group

分 组	Bax	Bcl-2	Fas
WT IR 组	1.0 ± 0.10	1.0 ± 0.08	1.0 ± 0.03
WT IP 组	0.4 ± 0.02 ^a	13.0 ± 2.00 ^a	0.2 ± 0.05 ^a
WT IP + L-VNIO 组	0.8 ± 0.05 ^b	1.0 ± 0.05 ^b	0.9 ± 0.10 ^b
KO IR 组	0.3 ± 0.02	8.0 ± 0.40	0.3 ± 0.04
KO IP 组	0.8 ± 0.03 ^{bc}	2.0 ± 0.03 ^{bc}	1.1 ± 0.03 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$,与 WT IR 组相比;b 为 $P < 0.05$,与 WT IP 组相比;c 为 $P < 0.05$,与 KO IR 组相比。

3 讨 论

心脏缺血损伤一直是众多学者研究和关注的热点,既往认为短暂的心肌缺血造成的心肌可逆性

损伤会使之更难以耐受再次缺血损伤。因此认为多次短暂缺血必然发生累加而导致心肌坏死。1986年 Murry 等^[1]首次在狗的实验中发现短暂的冠状动脉缺血可以使心脏在经历后续长期缺血时的心肌梗死面积较单纯长期缺血时的面积明显缩小,于是提出缺血预处理的概念。即一次或几次短暂的重复缺血和复灌,能够增强心肌对以后较长时间心肌缺血缺氧的耐受能力。IP 的保护作用实际上是短暂缺血启动了机体的内源性保护机制,提高了组织对缺血的耐受性^[5,6]。缺血预处理保护主要分为三个时相^[7]:①触发阶段:预适应引起一些内源性的活性物质释放,作用于其相应的细胞受体或者直接激活下游的信号通路启动保护过程。内源性活性物质及相应的受体即为触发物质及感受器。②信号转导:由受体后的信号物质相互作用,将预适应刺激向下游传递,引起下游功能物质的活性发生改变。③效应阶段:由效应子介导。效应子主要指离子通道、新合成的功能蛋白等。在效应阶段效应子活性和功能发生了变化,从而参与保护作用。无论在整体水平、器官水平还是细胞水平,这种保护作用都非常明显,具体主要体现在减轻心肌细胞的坏死,缩小梗死面积,减轻心肌细胞的凋亡程度,减少恶性心律失常的发生,明显改善心脏功能,如心脏的收缩力提高,舒缩功能加强,左心室射血分数增加等。

由于 IP 是迄今为止发现的最为强大的内源性保护机制,因而对其机制的探讨成为国内外学者多年来研究的热点。大量研究表明,IP 可能通过刺激心脏释放内源性心肌保护物质,随后激活细胞内信号转导途径而发挥保护作用。因此寻找与研究内源性活性物质是阐明 IP 心脏保护作用的关键。目前已证实一些重要的内源性物质如腺苷、儿茶酚胺、缓激肽等可能参与激活和介导 IP 的保护作用。已知这些物质可通过激活 NOS 产生 NO,提示 NO 也可能是一种潜在的激动剂和中介剂。NO 是左旋精氨酸在 NOS 的作用下合成的,是一种具有多种生物活性的小分子物质,能参与心血管疾病的病理生理过程^[8]。NOS 分为三种,即 nNOS、eNOS 和 iNOS。虽然三种 NOS 的基因编码不同,但结构有相似性,因而功能上也存在相似性^[9]。三种 NOS 除主要分布于胞浆的可溶性成分中外,也存在于一些亚细胞器中^[10],不同的组织可有同一种 NOS,但同组织内的同种 NOS,在不同的状态下可能功能是不同的。多数研究支持 NOS 系统介导缺血预处理,尤其是缺血预处理第二窗口的心肌保护作用。本研究结果

显示,nNOS 抑制剂预处理和 nNOS 基因敲除可以逆转早期 IP 的保护作用,这表明 nNOS 参与了早期 IP。我们推测以下机制可以解释 nNOS 参与早期 IP,首先,nNOS 分布在线粒体和心肌肌浆网^[11],从而区域化释放 NO,在调节细胞内和线粒体中钙离子动力学方面发挥关键作用,从而影响心肌收缩力。因此,nNOS 敲除后可能会影响 IP 引起的线粒体钙超载降低。其次,iNOS 激活可能也参与 nNOS KO IP 小鼠心肌损伤加重的作用。最后,IP 周期可能会影响实验结果,因为不同的 IP 周期提供不同的实验结果。

综上所述,nNOS 在心肌缺血预处理时发挥抑制心肌细胞凋亡的作用。

[参考文献]

- [1] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA, et al. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. *Circulation*, 1986, 74: 1124-1136.
- [2] Guo Y, Jones WK, Xuan YT, et al. The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 5115-5120.
- [3] Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, et al. Endothelial nitric oxide synthase plays an obligatory role in the late phase of ischemic preconditioning by activating the protein kinase C epsilon p44/42 mitogen-activated protein kinase pSer-signal transducers and activators of transcription1/3 pathway [J]. *Circulation*, 2007, 116: 535-544.
- [4] Wang Y, Kodani E, Wang J, et al. Cardioprotection during the final stage of the late phase of ischemic preconditioning is mediated by neuronal NO synthase in concert with cyclooxygenase-2 [J]. *Circ Res*, 2004, 95: 84-91.
- [5] 李淑莲, 齐永芬, 陈亚红, 等. Calcineurin 在大鼠心脏缺血预处理中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, 8(2): 103-106.
- [6] 张梅, 黄体钢, 杨万松, 等. 预处理对心肌细胞的保护作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, 8(2): 127-130.
- [7] Kharbanda RK. Cardiac conditioning: a review of evolving strategies to reduce ischaemia-reperfusion injury [J]. *Heart*, 2010, 96(15): 1179-1186.
- [8] 谢晋良, 曹文露, 周成, 等. 一氧化氮合酶在肾脏缺血预处理中的表达 [J]. *中国现代医学杂志*, 2002, 12(24): 35-37.
- [9] 张雪娟, 陈清启, 宋力, 等. 自发性高血压大鼠不同时期肾脏中一氧化氮合酶的变化 [J]. *中国现代医学杂志*, 2003, 13(6): 12-16.
- [10] Bell RM, Yellon DM. The contribution of endothelial nitric oxide synthase to early ischaemic preconditioning: the lowering of the preconditioning threshold. An investigation in eNOS knockout mice [J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 52: 274-280.
- [11] Deng Y, Kaufman S. Splenorenal reflex regulation of arterial pressure [J]. *Hypertension*, 2001, 38: 348-352.

(此文编辑 李小玲)