

过表达 Bax 抑制剂 1 通过抑制线粒体通透性转换孔开放及细胞凋亡减轻心肌缺血再灌注损伤

钟小兰, 班努·库肯, 景江新

(新疆医科大学第二附属医院心内科, 新疆乌鲁木齐市 830063)

[关键词] 心肌缺血再灌注; Bax 抑制剂 1; 线粒体通透性转换孔; Bcl-2/Bax; 细胞色素 C

[摘要] **目的** 探讨过表达 Bax 抑制剂 1 (BI-1) 基因对缺血再灌注损伤的影响及其相关机制。**方法** 30 只 SD 大鼠随机分为假手术组、缺血再灌注组 (I/R 组)、对照的腺病毒载体组 (Ad-EGFP 组)、过表达 BI-1 的腺病毒载体组 (Ad-BI-1 组)、环孢素 A (CsA 组)。建立大鼠心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 模型后, TTC 染色观察各组大鼠心肌梗死面积, TUNEL 染色观察心肌细胞凋亡情况, 电镜下观察心肌细胞超微结构变化, qRT-PCR 检测各组大鼠心肌组织中 BI-1 mRNA 表达。分离培养乳鼠心肌细胞并按细胞处理方式的不同将其分为对照组、缺氧复氧组 (H/R 组)、对照的腺病毒载体组 (Ad-EGFP 组)、过表达 BI-1 的腺病毒载体组 (Ad-BI-1 组)、环孢素 A (CsA 组), 免疫荧光法检测 BI-1 的亚细胞定位, Western blot 检测各组细胞中 BI-1 蛋白表达, Calcein-AM 法检测各组心肌细胞线粒体通透性转换孔 (MPTP) 开放水平; 应用 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、细胞色素 C (CytC) 及 Caspase-3、Caspase-9 的表达。**结果** 缺血再灌注后, 与假手术组相比, I/R 组、Ad-EGFP 组、Ad-BI-1 组、CsA 组大鼠心肌梗死面积显著增加, 心肌细胞凋亡数明显增多, 心肌线粒体结构受损显著加重 ($P < 0.05$); 而与 I/R 组或 Ad-EGFP 组相比, Ad-BI-1 组、CsA 组大鼠的上述指标明显改善 ($P < 0.05$)。qRT-PCR 结果显示, 与假手术组相比, I/R 组、Ad-EGFP 组、CsA 组中 BI-1 mRNA 表达均显著降低, 而 Ad-BI-1 组 BI-1 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$)。成功分离乳鼠心肌细胞, 免疫细胞结果显示 BI-1 主要定位于心肌细胞内质网; 与对照组相比, H/R 组、Ad-EGFP 组、Ad-BI-1 组及 CsA 组的 Calcein-AM 荧光强度显著降低 ($P < 0.05$), 而 Ad-BI-1 组及 CsA 组较 H/R 组细胞明显增加 ($P < 0.05$); Western blot 结果显示, H/R 组、Ad-EGFP 组、CsA 组中 BI-1 蛋白表达较对照组显著降低 ($P < 0.05$), 而 Ad-BI-1 组 BI-1 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$)。此外, 在大鼠心肌组织中, 与假手术组相比, I/R 组、Ad-EGFP 组、Ad-BI-1 组与 CsA 组大鼠的 Bcl-2/Bax 比值均显著降低 ($P < 0.05$), 凋亡蛋白 Caspase-3、Caspase-9 表达均显著增加 ($P < 0.05$), 而 Ad-BI-1 组及 CsA 组大鼠的 Bcl-2/Bax 比值明显高于 I/R 组 ($P < 0.05$), Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达亦较 I/R 组明显降低 ($P < 0.05$)。CytC 表达结果显示, 在心肌组织总蛋白中, 与假手术组相比, I/R 组、Ad-EGFP 组、Ad-BI-1 组及 CsA 组大鼠中 CytC 表达均显著升高 ($P < 0.05$), 且后四组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 但在心肌细胞线粒体中, I/R 组、Ad-EGFP 组、Ad-BI-1 组及 CsA 组大鼠的 CytC 表达均显著降低 ($P < 0.05$), 且 Ad-BI-1 组及 CsA 组大鼠较 I/R 组明显增加 ($P < 0.05$)。**结论** 过表达 BI-1 基因能够缩小 MIRI 大鼠的心肌梗死面积, 减轻心肌细胞的凋亡并改善线粒体结构及功能损伤, 其作用机制可能是过表达 BI-1 通过改变 Bcl-2/Bax 比值, 抑制 MPTP 的开放, 减少细胞 CytC 的释放, 降低凋亡蛋白 Caspase-3 及 Caspase-9 的活化而发挥上述作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Overexpression of Bax inhibitor-1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening and apoptosis

ZHONG Xiaolan, Bannu · kuken, JING Jiangxin

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830063, China)

[KEY WORDS] myocardial ischemia-reperfusion; Bax inhibitor-1; mitochondrial permeability transition pore;

[收稿日期] 2020-02-11

[修回日期] 2020-04-03

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2017D01C248)

[作者简介] 钟小兰, 硕士, 副主任医师, 研究方向为冠心病的诊疗, E-mail 为 zxl0138@163.com。通信作者景江新, 硕士, 副主任医师, 研究方向为心脏超声。

Bcl-2/Bax; CytC

[**ABSTRACT**] **Aim** To investigate the effect of overexpression of Bax inhibitor-1 (BI-1) gene in cardiomyocytes on ischemia-reperfusion injury and its mechanism. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into sham operation group (sham group), ischemia-reperfusion group (I/R group), adenovirus control group (Ad-EGFP group), overexpression of BI-1 genome group (Ad-BI-1 group), cyclosporine A group (CsA group). After the establishment of myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) model in rats, TTC staining was used to observe myocardial infarction area, TUNEL staining was used to observe myocardial apoptosis, ultrastructural changes of myocardial cells were observed under electron microscope; qRT-PCR was used to detect the expression of BI-1 mRNA in the myocardium of rats in each group. The myocardial cells of neonatal rats were isolated and cultured and divided into control group, hypoxia/reoxygenation group (H/R group), adenovirus control group (Ad-EGFP group), overexpression of BI-1 genome group (Ad-BI-1 group) and cyclosporine A group (CsA group) according to different cell treatment. The subcellular localization of BI-1 was detected by immunocytochemistry, the expression of BI-1 protein was detected by Western blot, and the MPTP opening level of myocardial mitochondria was detected by Calcein-AM; and the expression of apoptosis related proteins Bcl-2, Bax, CytC, Caspase-3 and Caspase-9 were detected by Western blot. **Results** Compared with sham group, myocardial infarct area, apoptosis number, mitochondrial structure damage in I/R group, Ad-EGFP group, Ad-BI-1 group and CSA group increased significantly ($P < 0.05$), while those in Ad-BI-1 group and CsA group decreased significantly ($P < 0.05$) compared with I/R group. qRT-PCR results showed that compared with sham group, BI-1 mRNA expression decreased significantly in I/R group, Ad-EGFP group and CsA group, while it increased significantly in Ad-BI-1 group; Subcellular location showed that BI-1 was mainly located in the endoplasmic reticulum of cardiomyocytes, and the fluorescence intensity of Calcein-AM was significantly lower in H/R group, Ad-EGFP group, Ad-BI-1 and CsA group than that in control group, while that of Ad-BI-1 and CsA group was significantly higher than that of H/R group; Compared with control group, the expression level of BI-1 protein was significantly decreased in H/R group, Ad-EGFP group and CsA group, but it was significantly increased in Ad-BI-1 group. Western blot results showed that compared with sham group, the ratio of Bcl-2/Bax decreased significantly in I/R group, Ad-EGFP group, Ad-BI-1 group and CsA group ($P < 0.05$), the expression of Caspase-3 and Caspase-9 increased significantly ($P < 0.05$); while the ratio of Bcl-2/Bax increased significantly in Ad-BI-1 group and CsA group compared with I/R group ($P < 0.05$), and the expression of Caspase-3 and Caspase-9 decreased significantly ($P < 0.05$). The expression of CytC was significantly higher in I/R group, Ad-EGFP group, Ad-BI-1 group and CsA group than that of sham group ($P < 0.05$). However, the expression of CytC in the mitochondria of myocardial cells was significantly lower in I/R group, Ad-EGFP group, Ad-BI-1 group and CsA group than that of sham group ($P < 0.05$), and the expression of CytC was significantly higher in the Ad-BI-1 group and the CsA group than that of I/R group ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of BI-1 gene can reduce the myocardial infarct area of MIRI rats, reduce the apoptosis of myocardial cells and improve the mitochondrial structure and function damage. The mechanism may be that overexpression of BI-1 can play the above role by changing the Bcl-2/Bax ratio, inhibiting the opening of MPTP, reducing the release of CytC, and reducing the activation of Caspase-3 and Caspase-9.

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 是指缺血心肌在恢复血流灌注后, 心肌细胞结构受损及细胞功能障碍进一步加剧的现象, 这常常导致心肌的梗死范围扩大, 并进一步加重心功能损害^[1]。因此, 针对改善 MIRI 的研究对提高临床治疗及改善患者预后具有重要意义。目前, 关于 MIRI 的机制报道较为复杂, 钙超载、氧化应激、细胞凋亡、炎症及线粒体功能障碍等均起着重要作用且相互关联^[2]。线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 是位于线粒体内外膜之间的非特异性通道, 大量研究表明, MPTP 开放在 MIRI 发病过程中起着重要的作用, 抑制 MPTP 开放可在心肌缺血后发挥

保护作用^[3]。而环孢素 A (cyclosporin A, CsA) 可通过与细胞内基质亲环蛋白 D 相互结合来抑制 MPTP 开放^[4]。既往体内外研究发现, CsA 能够通过上述原理防止 MIRI, 缩小心肌梗死面积并保留再灌注后的心功能等^[4-5]。

Bax 抑制剂 1 (Bax inhibitor-1, BI-1) 是近年来发现的凋亡抑制因子, 其不属于细胞程序性死亡有关的任何基因家族, 是少数几种同时存在于动植物中的保守性细胞死亡抑制因子之一。研究发现, BI-1 主要通过抑制线粒体相关的凋亡途径阻断细胞凋亡过程^[6-7]。在 MIRI 中, MPTP 开放导致线粒体膜通透性增加, 继而膜内外离子浓度差和电位差失衡, 致使钠钾离子泵功能紊乱, 进而引发线粒体功

能障碍,膜电位降低,释放细胞色素 C (cytochrome C, CytC),启动细胞凋亡^[3,8]。近年来,有学者研究表明 BI-1 能够通过介导线粒体钙离子摄入调控 MPTP 功能而影响细胞凋亡^[9]。鉴于以上机制,我们认为过表达 BI-1 基因可能通过影响 MPTP 开放及细胞凋亡改善缺血再灌注心肌损伤,并通过建立大鼠 MIRI 模型进行验证。

1 材料和方法

1.1 主要材料

清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 30 只(体质量 250~300 g),1~3 天 SD 大鼠乳鼠 30 只,均由新疆医科大学动物实验中心提供;MPTP 抑制剂 CsA、戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司);线粒体提取试剂(Qiagen 公司);兔抗 Bcl-2、Bax、GAPDH 单克隆抗体(美国 Abcam 公司);小鼠抗 Caspase-3、Caspase-9 单克隆抗体(美国 Affinity 公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔、抗小鼠 IgG(广州晶彩生物公司);兔抗 GRP78、BI-1(美国 Santa Cruz 公司);Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 555 结合的山羊抗兔二抗、Lipofectamine™3000(美国 Invitrogen 公司);磷酸化蛋白提取试剂盒(江苏碧云天);Calcein-AM 试剂盒(武汉博士德);小鼠抗 CytC、COX IV 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);过表达 BI-1 的腺病毒载体(Ad-BI-1)及携带绿色荧光蛋白的对照腺病毒载体(Ad-EGFP)(滴度均为 1×10^9 PFU/mL)(上海吉凯基因技术有限公司);PCR 试剂盒(日本 TaKaRa);PCR 引物由上海生工合成。

1.2 心肌缺血再灌注损伤模型制备及分组

各组大鼠适应性喂养 1 周,检查心电图及体温正常。①Ad-BI-1 及 Ad-EGFP 腺病毒转染参考文献报道^[10-12]方法进行,简述如下:术前 12 h 禁食不禁水。经腹注射 40 mg/kg 的戊巴比妥钠麻醉大鼠后进行气管插管,按氧含量 330 mL/L、呼吸比 2:1、频率 70~80 次/min、潮气量 7~8 mL 的参数设置进行正压通气。左胸部常规消毒、铺巾后,于胸骨左缘 3、4 肋间开胸,逐层钝性分离,剪开心包,充分暴露心脏,分离左主动脉及肺动脉根部,用无损伤血管钳在左主动脉、肺动脉根部进行钳夹以阻断其血流,用 27 号针头在心尖区向左心室腔注入 0.1 mL 腺病毒试剂,10 s 后松开血管钳以恢复左主动脉、肺动脉血流。操作期间密切观察心脏变化。充分膨肺后关胸,并注射青霉素 10 万 U 预防感染。②心肌缺血再灌注模型制备:按照上述操作进行大鼠麻

醉及呼吸支持后,常规记录肢体 II 导联心电图,分离大鼠右侧股静脉,置入聚乙烯管以备药物注射。左胸部常规消毒、铺巾后,于胸骨左缘 3、4 肋间进胸,打开心包,以动脉圆锥与左心耳之间的左冠状静脉主干为标志,在左心耳下方 1~2 mm 分离左冠状动脉前降支(left anterior descending, LAD),5-0 的无创缝合线在其下方穿线,以活结结扎 LAD 血流,观察心电图出现 ST 段抬高(>0.15 mV)和(或)T 波高耸或弓背抬高,且左心室前壁颜色发绀及心肌收缩减弱时说明结扎成功,再灌注时解开活结,即可实现阻断的 LAD 血流再通,且心肌组织反应性充血,心电图 ST 段逐渐下降。③按随机数字表法将大鼠分为 5 组,每组 6 只,即假手术组(Sham):开胸后仅于 LAD 穿线但不进行结扎,并给予股静脉注射 1.5 mL 的生理盐水;心肌缺血再灌注损伤组(I/R 组):阻断 LAD 30 min 后,经股静脉给予 1.5 mL 的生理盐水,松开结扎线恢复血管再灌注,并逐层关胸;过表达 BI-1 的腺病毒载体组(Ad-BI-1 组)及对照的腺病毒载体组(Ad-EGFP 组):Ad-BI-1 及 Ad-EGFP 腺病毒转染 3 天后阻断 LAD 30 min,再恢复血流灌注;环孢素 A 组(CsA 组):阻断 LAD 30 min 后,并于再灌注前 5 min 经股静脉给予 CsA(10 mg/kg)后,再恢复血流灌注。再灌注 24 h 后,取材检测相关指标。

1.3 TTC 染色检测心肌梗死面积

再灌注后 24 h,摘取心脏,4 °C 预冷生理盐水冲净残余血液后,-20 °C 冷冻 1 h,切片至 1~2 mm 厚的截面,置于 10 mL/L 的三苯基四氮唑(TTC)溶液在 37 °C 孵箱中孵育 20 min。PBS 清洗组织切片后,将其在室温下于 4% 多聚甲醛中固定过夜。取出切片用滤纸吸除残余液体后,根据薄片上不同颜色划分区域,其中梗死区为灰白色,用 Image Pro Plus 6.0 软件计算心肌梗死面积(infarct size, IS)比例=左心室梗死总面积/左心室总面积×100%。以上实验单独重复 3 次。

1.4 透射电镜观察心肌细胞线粒体超微结构

再灌注后 24 h,按上述方法麻醉大鼠后,摘取心脏,在缺血危险区取适量新鲜心脏组织,2.5% 戊二醛固定,梯度酒精脱水、包埋、切片、加入醋酸铀和枸橼酸铅双染后制成超薄切片,于电子显微镜下观察心肌细胞超微结构变化,每个标本随机拍摄 5 张照片,每张照片随机选取 20 个线粒体进行观察,参考 Flameng 等^[13]方法进行线粒体损伤程度评分。0 级:线粒体超微结构完整,颗粒完好;1 级:线粒体轻度肿胀,嵴与基质结构正常,但颗粒出现缺失;2 级:

线粒体中度肿胀,基质透明,基质颗粒丧失,但嵴未被破坏;3级:线粒体重度肿胀,基质均匀透明出现凝固,基质颗粒丧失,嵴断裂;4级:线粒体严重肿胀,颗粒丧失,嵴完全断裂,线粒体内外膜完整性丧失。

1.5 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡

再灌注后 24 h,将摘取的心脏组织于 4% 多聚甲醛中固定,石蜡包埋,切片后按照 TUNEL 试剂盒说明书进行心肌组织细胞凋亡情况检测。每个切片随机选取 6 个视野计算凋亡指数(凋亡指数=凋亡细胞数/细胞总数×100%)。以上实验单独重复 3 次。

1.6 原代心肌细胞分离、转染及缺氧复氧模型建立

①原代心肌细胞的分离:取 SD 大鼠乳鼠心室肌细胞,应用 0.08% 的中性蛋白酶与 II 型胶原酶进行消化后,将其置于含 10% FBS 与 1% 青链霉素的 DMEM/HG 培养液中于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养,2 h 后更换培养液以利用差速贴壁法去除成纤维细胞与内皮细胞,收集未贴壁细胞并接种至 6 孔板中按上述条件进行培养。每天观察细胞生长情况,按需更换培养液,3~4 天时观察到细胞成片跳动即可使用。②心肌细胞的分组及缺氧复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)模型建立:将心肌细胞按实验目的分为 5 组,即对照组(Control):正常培养的心肌细胞;H/R 组:将心肌细胞置于不含葡萄糖和血清的 DMEM 中于 37 °C、95% N₂、5% CO₂ 的低氧培养箱中缺氧 1 h 后,更换为含 10% FBS 的 DMEM/HG 培养液于 37 °C、95% 空气、5% CO₂ 环境中复氧 8 h,建立缺氧复氧模型;过表达 BI-1 的腺病毒载体组(Ad-BI-1 组)及对照的腺病毒载体组(Ad-EGFP 组):将载有过表达 BI-1 及对照序列的腺病毒感染心肌细胞,24 h 后更换新鲜的培养基;并将感染后的心肌细胞按上述方法进行缺氧复氧处理;环孢素 A 组(CsA 组):即预先使用 10 μmol/L 的 CsA 处理心肌细胞后将按上述方法进行缺氧复氧处理。

1.7 BI-1 在心肌细胞中亚定位检测

心肌细胞爬片处理完成后,4% 多聚甲醛于室温下固定 15 min 后,0.3% Triton X-100 于 4 °C 下通透 5 min,10% 山羊血清封闭 1 h 后,将 GRP78 抗体(1:500)、BI-1(1:800)于 4 °C 下孵育过夜。次日,PBS 漂洗细胞后,加入 Alexa Fluor 488 或 Alexa Fluor 555 结合的二抗(1:2000)于室温下孵育 2 h,PBS 再次漂洗后,加入 DAPI 染核 3 min,最后在荧光显微镜下拍照。

1.8 提取大鼠心肌线粒体

再灌注后 24 h,按上述方法麻醉大鼠后,将摘取的心脏组织用灭菌后的眼科剪进行剪碎至 2 mm³,按照线粒体提取试剂盒说明书方法于冰上提取大鼠心肌线粒体,方法简述如下:将剪碎的心肌组织置于匀浆器内,加入 500 μL 裂解液进行匀浆,加入 1.5 mL 裂解液,4 °C 3 000 r/min 离心 10 min,向底层沉淀中加入 1.5 mL 裂解液,重复上述匀浆过程,再次 4 °C 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,6 000 g 离心 20 min,进行纯化后,置于 1 mL 的线粒体保存液中进行储存。

1.9 MPTP 开放水平的检测

采用 Calcein-AM 释放试验检测心肌细胞 MPTP 开放水平。简述如下:各组心肌细胞按上述方法缺氧或 CsA 处理后,1 mmol/L 的 Calcein 与氯化钴于室温下孵育 30 min,复氧 20 min 后即用于 Hank 平衡盐溶液漂洗细胞,并将细胞培养液更换为无钙离子的 1 mmol/L 氯化钴的 DMEM/HG 培养液,分别应用 200 μmol/L 的 MitoTracker Red CMXRos 与 1 μmol/L Hoechst33342 对线粒体及细胞核染色 5 min。荧光共聚焦显微镜观察 Calcein-AM 的荧光强度。

1.10 实时荧光定量 PCR 实验

将各组大鼠的心肌组织在液氮中研磨后,按照 Trizol 法提取组织中总 RNA,经纯度检测与定量后,根据反转录试剂说明书反转录为 cDNA。再按照 qRT-PCR 试剂盒说明书及预实验确定的反应时间与温度进行实时定量。qRT-PCR 反应条件为:95 °C 预变性 10 min 后,95 °C 变性 7 s→60 °C 退火 20 s→72 °C 延伸 38 s,40 个循环。qRT-PCR 引物为:BI-1 上游 5'-CCTCTTCTGCTGGATGC-3',下游 5'-GCCTCGCTCTGTGATGTGA-3';GAPDH 上游 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTG-3',下游 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。以 GAPDH 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 方法分析 BI-1 mRNA 的表达量。

1.11 Western blot 实验

利用蛋白质提取试剂盒提取各组大鼠心肌缺血区和各组原代心肌细胞中的总蛋白。BCA 法进行蛋白定量,按照 1:4 比例向上清液中加入 5× 上样缓冲液,并于沸水中加热变性 10 min。取 30 μg 的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳进行蛋白分离,采用湿转法将分离的蛋白转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶于室温下封闭 2 h 后,分别加入 BI-1(1:500)、Bcl-2(1:1500)、Bax(1:1000)、Caspase-3(1:1000)、Caspase-9(1:1000)、GAPDH(1:2000)一抗,4 °C 摇床孵育过夜。TBST

溶液清洗 3 次, 5 min/次, 以 HRP 标记的二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, 以 TBST 溶液清洗 3 次, 5 min/次。CytC 的检测: 选取 1.8 中分离纯化的心肌线粒体与缺血区的心肌组织, 应用蛋白质提取试剂盒提取线粒体与心肌组织中的总蛋白, 其余步骤同上, 加入 CytC (1:1 000), COX IV (1:2 000) 为内参。最后在载有蛋白条带的 PVDF 膜上均匀滴加 ECL 发光液后于凝胶成像仪进行曝光拍照。Image J 软件测定条带灰度值, 以目标蛋白与内参的比值作为其相对含量。以上实验单独重复 3 次。

1.12 统计学分析

采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析。数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独

立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 的 Dunnett's 或 Bonferroni's 多重比较进行分析; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 BI-1 减轻大鼠心肌梗死面积

TTC 双染法检测大鼠心肌梗死面积, 结果显示与假手术组相比, I/R 组、Ad-EGFP 组、Ad-BI-1 组及 CsA 组大鼠心肌梗死面积显著增加 ($P < 0.05$); 而与 I/R 组大鼠相比, Ad-BI-1 组和 CsA 组大鼠心肌梗死面积明显减少 ($P < 0.05$), 后两组大鼠之间心肌梗死面积差异无显著性 ($P > 0.05$; 图 1)。

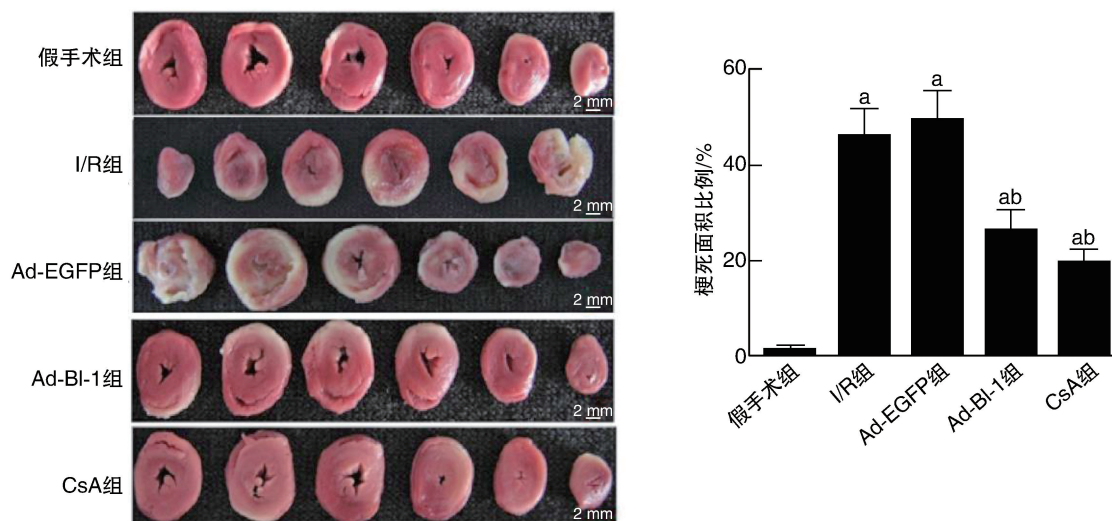


图 1. TTC 染色观察心肌梗死面积 ($n=3$)

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 I/R 组相比。

Figure 1. Myocardial infarction area observed after TTC staining ($n=3$)

2.2 过表达 BI-1 减轻大鼠心肌细胞凋亡

各组大鼠心肌组织经 TUNEL 染色后, 正常细胞核为蔚蓝色, 而凋亡细胞核为棕褐色 (红色箭头指示)。实验结果表明假手术组大鼠心肌组织无明显细胞凋亡, I/R 组、Ad-EGFP 组、Ad-BI-1 组和 CsA 组大鼠的心肌组织中凋亡的细胞较假手术组均显著增加 ($P < 0.05$), 而 Ad-BI-1 组和 CsA 组大鼠凋亡细胞明显少于 I/R 组 ($P < 0.05$), 后两组大鼠之间心肌细胞凋亡无统计学差异 ($P > 0.05$; 图 2)。

2.3 过表达 BI-1 减轻大鼠心肌细胞线粒体损伤

透射电镜观察大鼠心肌细胞超微结构改变, 结果表明假手术组大鼠心肌细胞线粒体结构完整, 外膜光滑无肿胀, 基质内颗粒丰富; I/R 组和 Ad-EGFP 组大鼠心肌细胞线粒体结构大量破坏, 发生肿胀,

棘突排列紊乱, 线粒体膜破损严重, 基质内颗粒明显减少, 且能够见到少量空泡样变性 (红色箭头指示); Ad-BI-1 组和 CsA 组大鼠可见心肌细胞线粒体结构多数完整, 棘突变短、数目减少, 但棘断裂少见, 基质内颗粒丰富, 仅少数线粒体出现肿胀、膜破损现象 (图 3)。

2.4 过表达 BI-1 抑制心肌细胞线粒体 MPTP 的开放水平

Calcein-AM 法检测原代心肌细胞线粒体 MPTP 的开放水平, 结果发现, 与对照组相比, H/R 组、Ad-EGFP 组、Ad-BI-1 组及 CsA 组细胞的 Calcein-AM 荧光强度显著降低, 提示 MPTP 开放水平明显升高 ($P < 0.05$); 而 Ad-BI-1 组和 CsA 组细胞的 Calcein-AM 荧光强度显著高于 H/R 组 ($P < 0.05$); 后两组细胞

的 Calcein-AM 荧光强度差异无显著性 ($P>0.05$)。 的开放水平(图 4)。 结果提示,过表达 BI-1 能够抑制心肌细胞中 MPTP

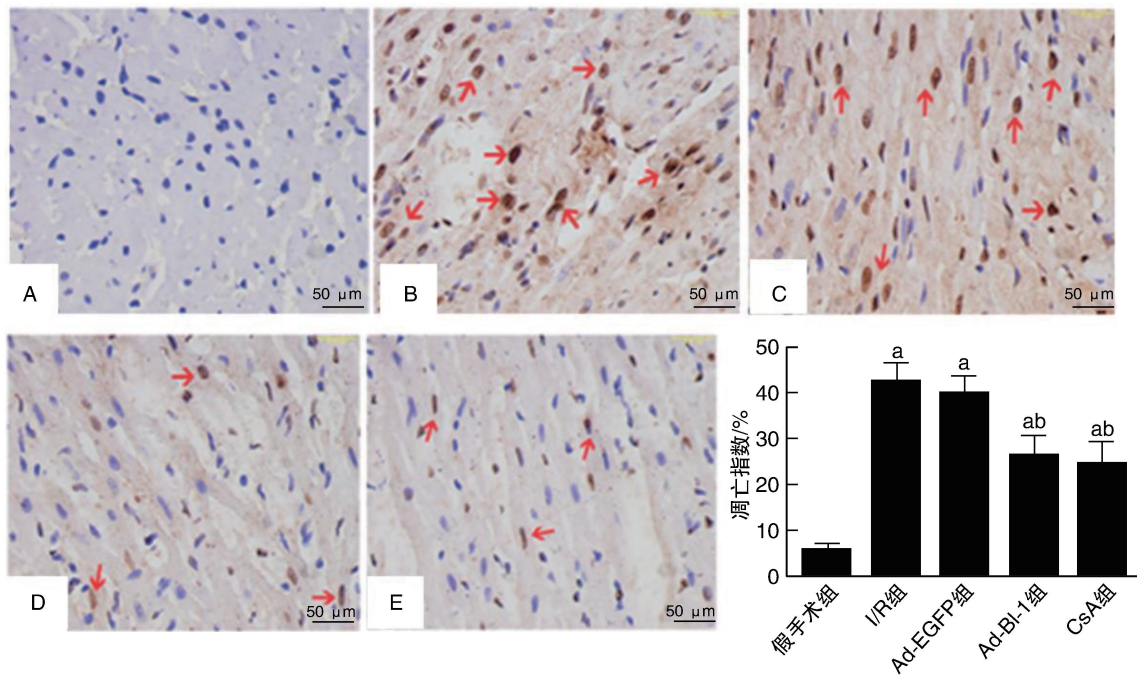


图 2. TUNEL 染色观察心肌细胞凋亡 ($n=3$)

A 为假手术组, B 为 I/R 组, C 为 Ad-EGFP 组, D 为 Ad-BI-1 组, E 为 CsA 组。

a 为 $P<0.05$, 与假手术组相比; b 为 $P<0.05$, 与 I/R 组相比。

Figure 2. Apoptosis of cardiomyocytes observed by TUNEL staining ($n=3$)

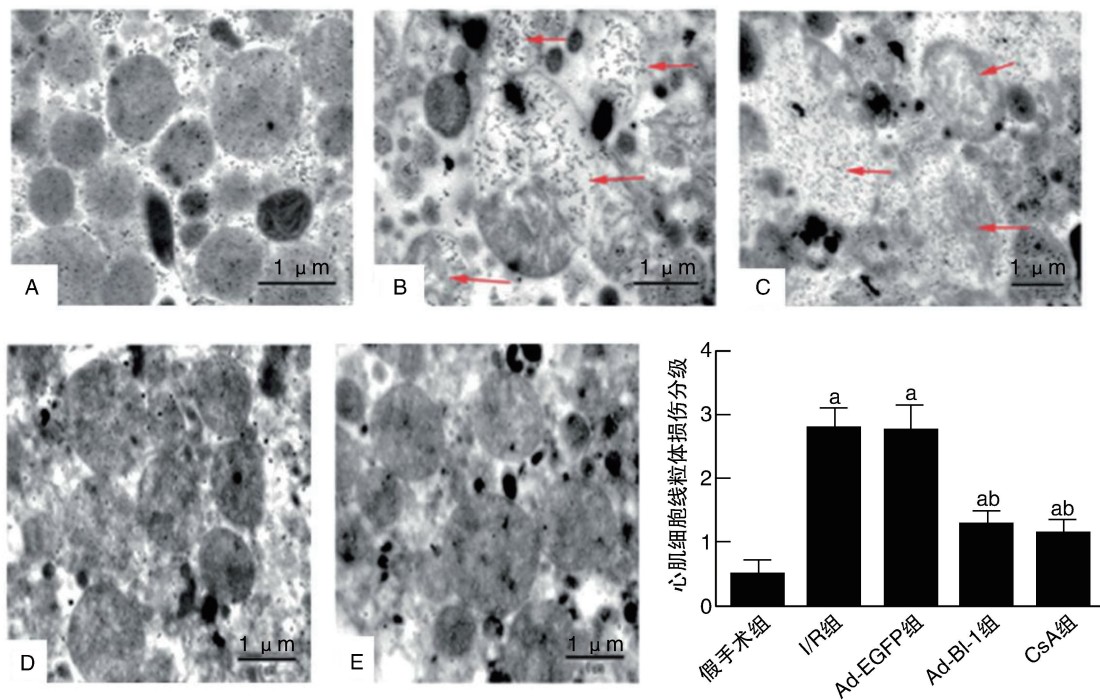


图 3. 透射电镜观察心肌细胞线粒体结构变化 ($n=3$)

A 为假手术组, B 为 I/R 组, C 为 Ad-EGFP 组, D 为 Ad-BI-1 组, E 为 CsA 组。 a 为 $P<0.05$, 与假手术组相比; b 为 $P<0.05$, 与 I/R 组相比。

Figure 3. Changes of mitochondrial structure of cardiomyocytes observed by transmission electron microscope ($n=3$)

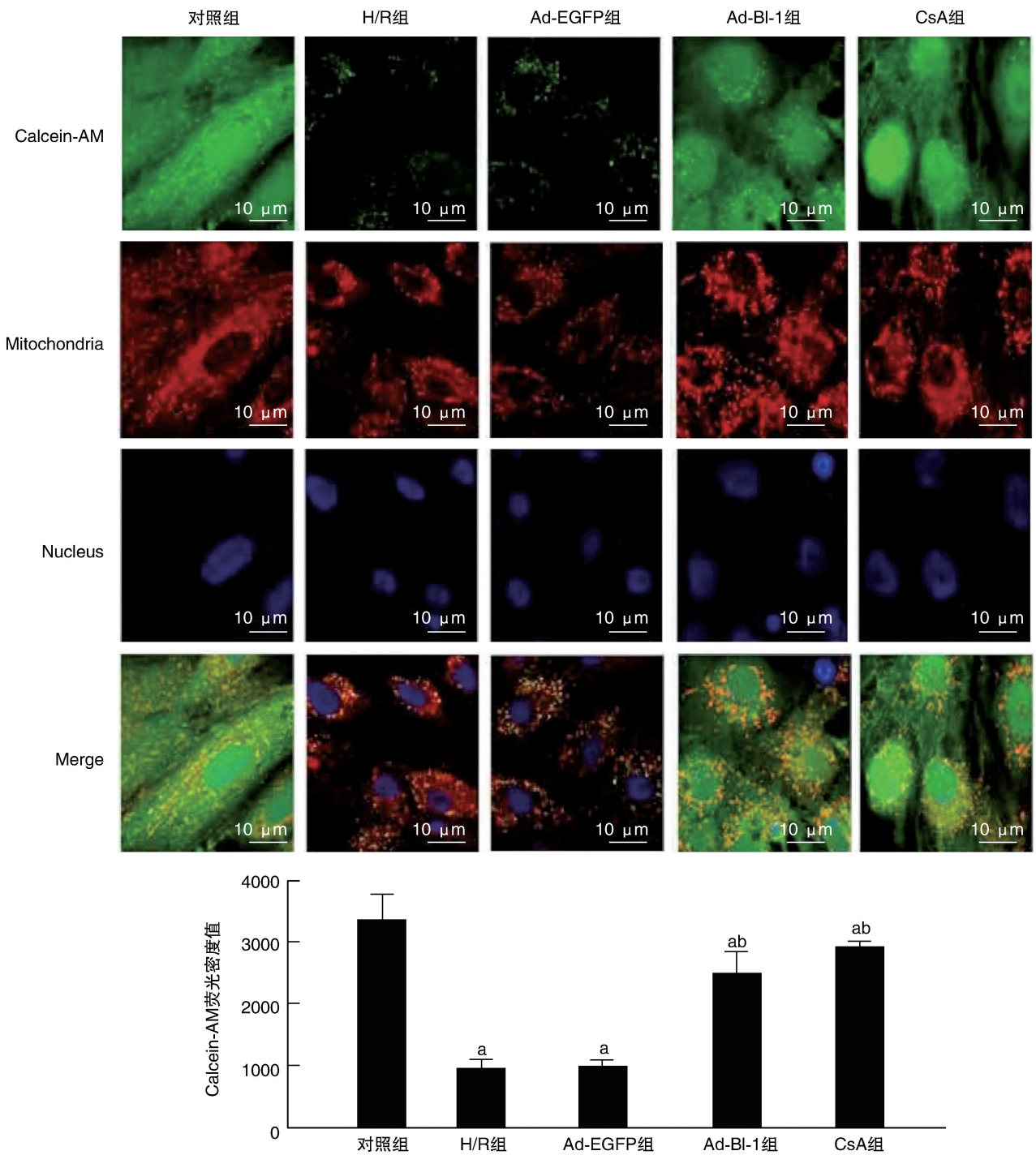


图 4. Calcein-AM 法检测线粒体 MPTP 开放水平 (n=3)

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 H/R 组相比。

Figure 4. Detection of mitochondrial MPTP opening level by Calcein-AM method (n=3)

2.5 缺血再灌注/缺氧复氧对心肌细胞 BI-1 表达的影响及 BI-1 的亚细胞定位

qRT-PCR 检测各组原代心肌细胞中 BI-1 mRNA 的表达水平, 结果表明与对照组相比, H/R 组、Ad-EGFP 组及 CsA 组心肌细胞中 BI-1 mRNA 表达水平均显著下降 ($P < 0.05$), Ad-BI-1 组中 BI-1

mRNA 表达水平较其他组均明显增加 ($P < 0.05$), CsA 组中 BI-1 mRNA 表达较 H/R 组明显增加 ($P < 0.05$, 图 5A)。Western blot 检测各组原代心肌细胞中 BI-1 蛋白表达水平, 结果表明与对照组相比, H/R 组、Ad-EGFP 组及 CsA 组心肌细胞中 BI-1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), 而 Ad-BI-1 组中 BI-1

蛋白表达较其他组均明显增加($P < 0.05$), CsA 组细胞中 BI-1 蛋白表达水平较 H/R 组明显增加($P <$

0.05 , 图 5B)。BI-1 在原代心肌细胞中亚定位结果表明, BI-1 主要表达于内质网中(图 5C)。

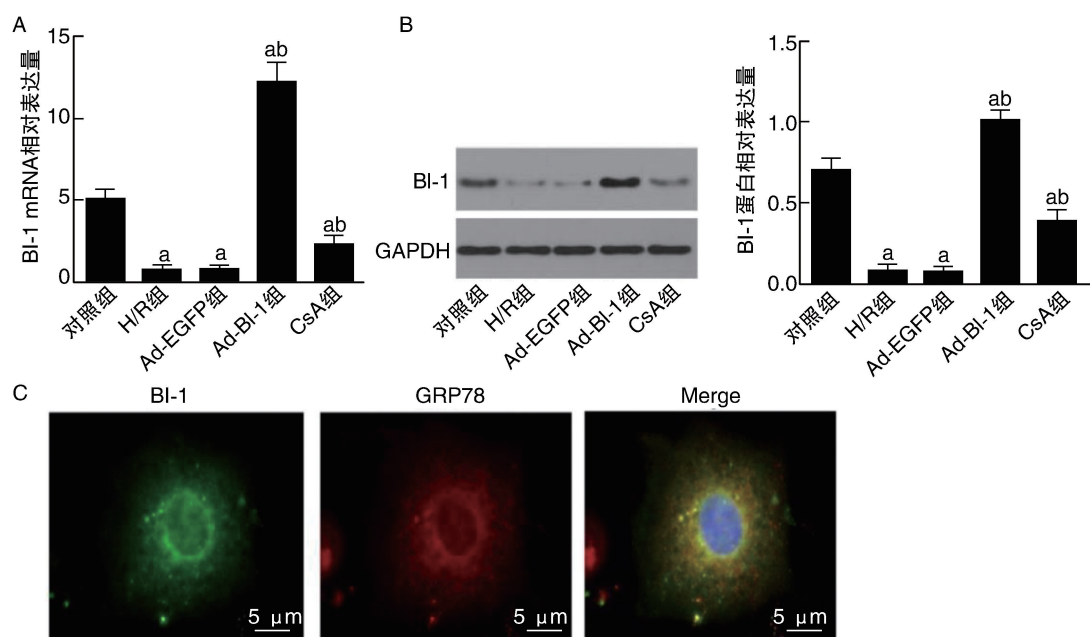


图 5. 各组原代心肌细胞中 BI-1 表达变化及 BI-1 在细胞中的亚定位($n=3$)

A 为 qRT-PCR 检测各组心肌细胞中 BI-1 mRNA 表达水平, B 为 Western blot 检测各组心肌细胞中 BI-1 蛋白表达差异, C 为 BI-1 在原代心肌细胞中的亚细胞定位的免疫荧光检测。a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 H/R 组相比。

Figure 5. The expression level of BI-1 in primary cardiomyocytes of each group and the sublocalization of BI-1 in cardiomyocytes ($n=3$)

2.6 过表达 BI-1 对各组大鼠心肌组织中 Bcl-2/Bax、CytC 及 Caspase-3、Caspase-9 表达的影响

Western blot 结果表明, 与假手术组相比, I/R 组、Ad-EGFP 组、Ad-BI-1 组及 CsA 组大鼠心肌细胞中 Bcl-2/Bax 比值均显著降低($P < 0.05$), 而 Ad-BI-1 组及 CsA 组大鼠的 Bcl-2/Bax 比值明显高于 I/R 组($P < 0.05$), 后两组之间的 Bcl-2/Bax 比值差异无显著性($P > 0.05$; 图 6)。凋亡蛋白 Caspase-3、Caspase-9 检测结果表明, 与假手术组相比, I/R 组、Ad-EGFP 组、Ad-BI-1 组及 CsA 组大鼠心肌组织中上述两种蛋白表达均显著增加($P < 0.05$), 而 Ad-BI-1 组和 CsA 组大鼠较 I/R 组明显减少($P < 0.05$), 后两组间 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达差异无显著性($P > 0.05$; 图 6)。CytC 表达结果显示, 在心肌细胞总蛋白中, 与假手术组相比, I/R 组、Ad-EGFP 组、Ad-BI-1 组及 CsA 组大鼠心肌细胞中 CytC 表达均显著升高($P < 0.05$), 且后四组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。但在心肌细胞线粒体中, I/R 组、Ad-EGFP 组、Ad-BI-1 组及 CsA 组大鼠的 CytC 表达均较假手术组显著降低($P < 0.05$), 且 Ad-BI-1 组及

CsA 组大鼠较 I/R 组明显增加($P < 0.05$), 后两组之间差异无统计学意义($P > 0.05$; 图 6)。

3 讨论

MIRI 常发生于缺血性心脏病再灌注治疗过程中, 是临床常见且亟待解决的病理生理现象。细胞凋亡对 MIRI 的预后具有重要影响。研究表明, 抑制 MIRI 过程中的心肌细胞凋亡能够减少梗死范围的扩大, 并有效保护心功能^[14]。线粒体是广泛存在于细胞中的一种重要细胞器, 在生理水平下线粒体处于稳定状态, 但当其损伤时, 可产生大量超氧化物和活性氧, 导致钙超载和氧化应激等不良刺激, 从而诱导细胞发生凋亡和坏死^[14]。大量研究证实, 线粒体功能异常在 MIRI 的发生发展过程中占有重要地位。MPTP 是线粒体功能的关键调节因子, 其异常开放能够诱导线粒体结构紊乱, 进而影响线粒体功能, 并最终导致细胞凋亡。在正常生理条件下 MPTP 保持闭合状态, 而钙离子超载和过度氧化应激等引起的再灌注可诱导其开放, 在缺血再灌注过

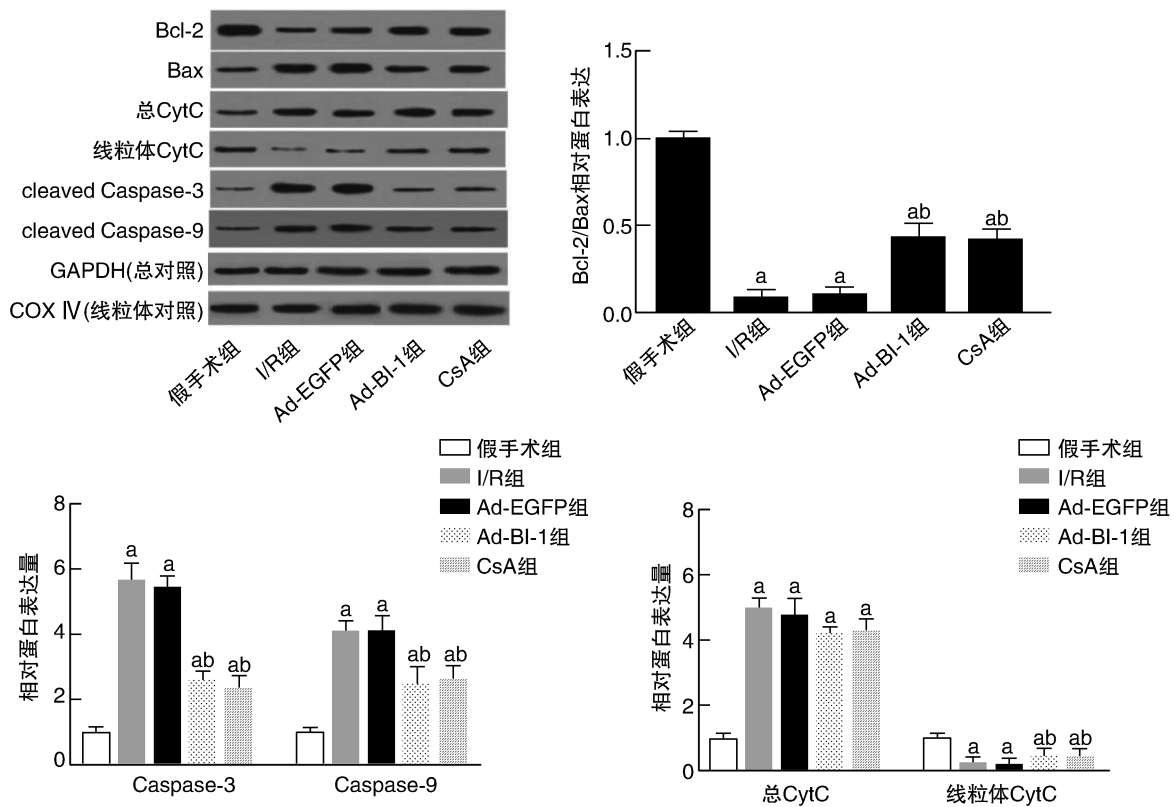


图 6. Western blot 检测大鼠心肌细胞中 Bcl-2/Bax、CytC 及 Caspase-3、Caspase-9 表达 (n=3)
a 为 P<0.05, 与假手术组相比; b 为 P<0.05, 与 I/R 组相比。

Figure 6. The expressions of Bcl-2/Bax, CytC, Caspase-3 and Caspase-9 in cardiomyocytes by Western blot (n=3)

程中能够诱发细胞死亡和组织损伤等作用^[15]。He 等^[16]研究发现,在大鼠 MIRI 模型中吗啡预处理能够通过减少心肌细胞钙离子超载的发生,阻遏 MPTP 的开放,降低 CytC 的释放从而抑制心肌细胞凋亡,发挥保护心肌的作用。CsA 通过与线粒体中的基质亲环蛋白 D 特异性结合,而阻止 MPTP 开放,从而抑制细胞发生凋亡^[17]。

BI-1 是新发现的一种凋亡抑制基因,其蛋白产物能够抑制由 Bax、星形细胞素等引起的凋亡。应用化学交联和免疫共沉淀实验发现,BI-1 并非与 Bax 直接作用,而是与抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-XL 相互结合,通过改变其表达,调节 BI-1/Bcl-XL/Bcl-2 和 Bax 比值,调控细胞凋亡^[18]。其可能的分子机制为:Bcl-2 和 Bcl-XL 可以与 Bax 形成 Bcl-2/Bax、Bcl-XL/Bax 异源二聚体,而使 Bax/Bax 同源二聚体形成减少,从而抑制 Bax 引起的凋亡。同时 Bax/Bax 同源二聚体能够促进线粒体释放 CytC,使其进入胞质,诱导细胞发生凋亡^[15,19-21]。此外,有研究报道,BI-1/Bcl-2 二聚体能够与 MPTP 的主要组成成分外膜电压依赖性离子通道 (voltage-dependent anion channel,VDAC) 相结合,从而通过抑制 MPTP 的形

成保护线粒体结构及功能的完整,进而发挥抗凋亡作用^[20]。近年来关于 BI-1 在心肌缺血再灌注的作用逐渐被人们所重视,如 Zhou 等^[22-23]在心肌缺血再灌注的微血管损伤中先后发现 BI-1 可通过 Syk-Nox2-Drp1 与 XO/ROS/F-actin 分子信号通路维持线粒体稳态以减轻心脏微血管再灌注损伤。

本研究实验结果表明,心肌细胞过表达 BI-1 基因能够缩小 MIRI 大鼠的心肌梗死面积,减轻心肌细胞的凋亡并改善线粒体结构及功能损伤,进一步通过 Western blot 分析凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspases 及 CytC 发现,过表达 BI-1 可能是通过改变 Bcl-2/Bax 比值,抑制 MPTP 的开放,减少细胞 CytC 的释放,降低凋亡蛋白 Caspase-3 及 Caspase-9 的活化而发挥上述作用。CytC 一般存在于线粒体的内外膜间隙之间,生理条件下其不能穿过线粒体外膜到达细胞质,在 MPTP 异常开放并导致线粒体膜结构发生损伤时,CytC 从线粒体内释放到胞质中,并作为重要的促凋亡因子,在三磷酸脱氧腺苷的协同作用下与凋亡蛋白酶活化因子 1 (apoptosis protease-activating factor 1,APAF-1) 相互结合,激活 Caspase-9,然后进一步激活下游的 Caspase-3,启动 Caspases 的

级联反应,最终导致细胞凋亡的发生。其中 Caspases 的活化是凋亡的中心环节,而 Caspase-3 是细胞凋亡过程中的关键执行者,它的活化是凋亡进入不可逆阶段的标志^[24-26]。

众所周知,MIRI 机制复杂,涉及到钙超载、氧化应激、细胞凋亡、炎症及线粒体功能障碍等因素,迄今尚无有效的治疗手段。本研究发现,心肌细胞过表达 BI-1 基因能够通过抑制心肌细胞凋亡,减轻心肌结构及功能损伤,从而发挥保护心肌的作用。而基因治疗是近年来疾病研究的热点,在癌症、自身免疫性疾病、传染性等疾病等领域已取得瞩目的成绩,其作为一种全新的治疗手段,必将在以后的疾病治疗中发挥关键作用。

[参考文献]

- [1] Neri M, Riezzo I, Pascale N, et al. Ischemia/reperfusion injury following acute myocardial infarction: a critical issue for clinicians and forensic pathologists[J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 7018393.
- [2] Lejay A, Fang F, John R, et al. Ischemia reperfusion injury, ischemic conditioning and diabetes mellitus[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 91: 11-22.
- [3] De Marchi E, Bonora M, Giorgi C, et al. The mitochondrial permeability transition pore is a dispensable element for mitochondrial calcium efflux[J]. *Cell Calcium*, 2014, 56(1): 1-13.
- [4] Hausenloy D, Kunst G, Boston-Griffiths E, et al. The effect of cyclosporin-A on peri-operative myocardial injury in adult patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled clinical trial[J]. *Heart*, 2014, 100(7): 544-549.
- [5] Cung TT, Morel O, Cayla G, et al. Cyclosporine before PCI in patients with acute myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(11): 1021-1031.
- [6] Ishikawa T, Aki T, Yanagisawa S, et al. Overexpression of Bax inhibitor-1 links plasma membrane microdomain proteins to stress[J]. *Plant Physiol*, 2015, 169(2): 1333-1343.
- [7] Bultynck G, Kiviluoto S, Methner A. Bax inhibitor-1 is likely a pH-sensitive calcium leak channel, not a H⁺/Ca²⁺ exchanger[J]. *Sci Signal*, 2014, 7(343): e22.
- [8] Petrosillo G, Di Venosa N, Moro N, et al. In vivo hyperoxic preconditioning protects against rat-heart ischemia/reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening and cytochrome C release[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(3): 477-483.
- [9] Lee GH, Lee HY, Li B, et al. Bax inhibitor-1-mediated inhibition of mitochondrial Ca²⁺ intake regulates mitochondrial permeability transition pore opening and cell death[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5194.
- [10] 杨昭云,徐军美,姜金玉,等.人白细胞介素-10和 Bcl-2 基因重组腺病毒经冠状动脉转染大鼠心肌的可行性[J].*中华麻醉学杂志*, 2006, 26(11): 1001-1004.
- [11] Kaspar BK, Roth DM, Lai NC, et al. Myocardial gene transfer and long-term expression following intracoronary delivery of adeno-associated virus[J]. *J Gene Med*, 2005, 7(3): 316-324.
- [12] 刘永平,魏来,陈文雁,等. PPAR γ 1 基因转染对缺血再灌注心肌细胞凋亡的作用和影响[J].*中国现代医学杂志*, 2017, 27(9): 25-29.
- [13] Flameng W, Borgers M, Daenen W, et al. Ultrastructural and cytochemical correlates of myocardial protection by cardiac hypothermia in man[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1980, 79(3): 413-424.
- [14] Latini R, Staszewsky L, Ottani F. Controversies on the role of mitochondria in coronary reperfusion damage as potential therapeutic target[J]. *G Ital Cardiol (Rome)*, 2015, 16(10): 544-548.
- [15] Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(9): 621-632.
- [16] He Z, Peng Z, Jin L, et al. Effect of morphine preconditioning on mitochondrial permeability transition pore after myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2010, 35(8): 800-806.
- [17] Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection[J]. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38(4): 841-860.
- [18] Xu Q, Reed JC. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast[J]. *Mol Cell*, 1998, 1(3): 337-346.
- [19] Pena-Blanco A, Garcia-Saez AJ. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis[J]. *FEBS J*, 2018, 285(3): 416-431.
- [20] Lindsay J, Esposti MD, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria-specificity in membrane targeting for death[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(4): 532-539.
- [21] Luna-Vargas M, Chipuk JE. Physiological and pharmacological control of BAK, Bax, and beyond[J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(12): 906-917.
- [22] Zhou H, Shi C, Hu S, et al. BI1 is associated with microvascular protection in cardiac ischemia reperfusion injury via repressing Syk-Nox2-Drp1-mitochondrial fission pathways [J]. *Angiogenesis*, 2018, 21(3): 599-615.
- [23] Zhou H, Wang J, Hu S, et al. BI1 alleviates cardiac microvascular ischemia-reperfusion injury via modifying mitochondrial fission and inhibiting XO/ROS/F-actin pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 5056-5069.
- [24] Joseph EK, Levine JD. Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat[J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 20(11): 2896-2902.
- [25] Mace PD, Riedl SJ, Salvesen GS. Caspase enzymology and activation mechanisms[J]. *Methods Enzymol*, 2014, 544: 161-178.
- [26] Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, et al. The coordinate release of cytochrome C during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(3): 156-162.

(此文编辑 许雪梅)