

河豚毒素对缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响

綦俊, 杨双强, 刘胜中 (重庆医科大学附属第一医院心胸外科, 重庆 400016)

摘要:目的 研究河豚毒素(TTX)心脏停搏液对缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响。方法 取 Wistar 大鼠 24 只, 建立 Langendorff-Neely 离体心脏灌注模型, 随机分为 3 组($n=8$): 基础组、STH-2 组、TTX 组。用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡指数, 免疫组化测定凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、p53 的表达, Western blot 检测 Bcl-2 蛋白表达。结果 STH-2 组凋亡指数(AI) (11.20 ± 0.79)% 高于 TTX 组 (6.92 ± 1.10)% 和基础组 (1.34 ± 0.23)% ($P < 0.01$)。TTX 组 Bcl-2 的 PEI 为 (22.63 ± 1.10)% 高于 STH-2 组 (13.51 ± 0.67)% 和基础组 (2.52 ± 0.58)% ($P < 0.01$); STH-2 组 Bax 的 PEI 为 (8.04 ± 0.57)% 高于 TTX 组 (6.05 ± 0.46)% 和基础组 (2.14 ± 0.57)% ($P < 0.01$)。TTX 组 Bcl-2/Bax 为 3.78 ± 0.41 高于 STH-2 组 1.75 ± 0.15 ($P < 0.01$)。TTX 组 Bcl-2 的相对蛋白含量为 (86.1 ± 0.98)% 高于 STH-2 组 (53.2 ± 1.76)% 和基础组 (23.7 ± 2.61)% ($P < 0.01$)。p53 蛋白在各组均未见明显阳性表达。结论 与 STH-2 比较, TTX 能减少缺血再灌注大鼠心肌细胞凋亡数, 其抗凋亡的机制可能与上调 Bcl-2 表达, 下调 Bax 表达, 提高 Bcl-2/Bax 比值有关。

关键词: 河豚毒素; 心肌缺血再灌注损伤; 心肌细胞凋亡; Bcl-2 蛋白; Bax 蛋白

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693 (2009) 03-0193-05

Effects of Tetrodotoxin Cardioplegia on Cardiomyocyte Apoptosis and Related Protein Expression in Rat Hearts

QI Jun, YANG Shuangqiang, LIU Shengzhong (Department of Cardiothoracic Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effects of tetrodotoxin (TTX) cardioplegia on cardiomyocyte apoptosis and related protein expressions in rat hearts. **METHODS** Twenty four wistar rats were randomly divided into 3 groups ($n=8$): Base group, STH-2 group and TTX group. Isolated rat Langendorff and Neely working heart models were established. The changes in cardiomyocyte apoptosis were detected by TUNEL, the expressions of Bcl-2, Bax protein were detected by immunohistochemical assay in cardiomyocyte. Additionally the expression of Bcl-2 protein in cardiomyocyte was detected by Western blot. **RESULTS** Apoptosis index (AI) in STH-2 group (11.20 ± 0.79)% was significantly higher than that in TTX group (6.92 ± 1.10)% and Base group (1.34 ± 0.23)% ($P < 0.01$). Bcl-2 protein expression index (PEI) in TTX group (22.63 ± 1.10)% increased as compared with STH-2 group (13.51 ± 0.67)% and

基金项目: 重庆市委课题 (CSTC, 2005AC0068)

作者简介: 綦俊, 男, 硕士, 主治医师

Tel: 13036399093

E-mail: qqyc2005@163.com

Base group(2.52 ± 0.58)% ($P < 0.01$) by immunohistochemical assay. Bax PEI in STH-2 group(8.04 ± 0.57)% increased as compared with TTX group(6.05 ± 0.46)% and Base group(2.14 ± 0.57)% ($P < 0.01$) by immunohistochemical assay. Bcl-2/Bax was 3.78 ± 0.41 in TTX group, 1.75 ± 0.15 in STH-2 group. Bcl-2 protein expression in TTX group(86.1 ± 0.98)% increased as compared with STH-2 group(53.2 ± 1.76)% and Base group(23.7 ± 2.61)% ($P < 0.01$) by Western blot. There was no sign of p53 protein expression in all groups by immunohistochemical assay in our experiment. **CONCLUSION** Compared with STH-2, TTX cardioplegia were all eviating the apoptosis of rat cardiomyocytes. The mechanism was probably up-regulating expression of Bcl-2 protein, down-regulating expression of bax protein and increasing Bcl-2/Bax.

KEY WORDS: TTX; myocardial ischemia reperfusion injury; cardiomyocyte apoptosis; Bcl-2 protein; Bax protein

河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)是一种快速可逆的细胞膜上钠离子(Na^+)通道阻滞剂,具有高特异性,在药理学、神经生理学等研究领域被广泛应用,是研究 Na^+ 通道最常用的工具药。目前,已从器官水平证明用 TTX 停搏并保存后的离体大鼠心脏在血流动力学、心肌酶学、能量物质保护和心肌细胞超微结构保护等方面明显优于传统的 St. Thomas 液^[1];从细胞水平证明与 St. Thomas 液比较,用 TTX 停搏并复搏的离体大鼠心肌细胞内 Na^+ 超载和 Ca^{2+} 超载均较轻,且心肌细胞活力更强^[2]。本实验从心肌细胞凋亡及凋亡相关蛋白的角度来研究 TTX 心脏停搏液的心肌保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及主要试剂 成年健康雄性 Wistar 大鼠 24 只(由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供),体重 250 ~ 300 g。TTX:美国 Sigma 公司。兔抗大鼠 Bcl-2 单克隆抗体、兔抗大鼠 Bax 单克隆抗体、兔抗大鼠 p53 单克隆抗体、兔抗大鼠 β -actin 单克隆抗体;Santa Cruz 公司。PVDF 膜;美国 DUPONT 公司。TENUL 试剂盒;南京凯基生物科技发展有限公司。SP-9001 免疫组化试剂盒;北京中杉生物公司。RIPA 细胞裂解液;上海申能博彩生物科技有限公司。

1.1.2 灌注液及停搏液配方 配方见表 1。

表 1 灌注液及停搏液配方

Tab 1 Content of buffer solution and cardioplegia

成分 /mmol · L ⁻¹	K - H 灌注液	STH - 2 心脏 停搏液	TTX 心脏 停搏液
NaCl	119	110	119
NaHCO ₃	25	-	25
KCl	4.75	116	4.75
MgSO ₄	1.2	-	1.2
KH ₂ PO ₄	1.18	-	1.18
CaCl ₂	1.4	2.0	1.4
Glucose	11	-	11
MgCl ₂	-	16	-
TTX/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	-	-	20
pH	7.8	7.8	7.8

1.1.3 主要仪器和设备 LE12306 离体心脏灌流系统;澳大利亚 ADInstruments 公司。PAGE 凝胶电泳仪、TRANS-BLOT SD 半干电转移系统;美国 Bio-Rad 公司。可见光/紫外凝胶扫描分析系统;美国 UVP 公司。扫描分析软件系统;美国 Labworks™ Analysis Software 公司。GD-8 型病理影像多媒体图文操作系统;成都金盘电子科大多媒体技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鼠离体心脏灌注模型的建立 腹腔注射肝素钠 200 u, 20 min 后脱颈处死大鼠,迅速取下心脏。建立离体鼠心 Langendorff 灌注模型,主动脉根部灌注 37 ℃, 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气持续氧合的 K-H 缓冲液,压力 60 mmHg。稳定后经左心耳插管,灌注液转流至左心房,建立 Neely 左心室工作灌注模型,灌注压 15 mmHg,后负荷 50 mmHg。

1.2.2 动物分组及实验步骤 随机均分为 3 组,每组 8 只。基础组为缺血前对照;STH-2 组和 TTX 组为缺血再灌注实验组。基础组:离体鼠心持续用 K-H 液灌注工作 60 min 后取左心室标本备检。TTX 组和 STH-2 组待离体鼠心持续用 K-H 液灌注工作 60 min 后,分别用 4 ℃ STH-2 和 TTX 心脏停搏液从主动脉根部缓慢灌注(2 min, 压力 60 mmHg)使心脏停搏;低温保存 60 min(其间 30 min 时分别追加灌注 STH-2 和 TTX 心脏停搏液 1 次);停搏 60 min 后复温,复灌 37 ℃, 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气持续氧合的 K-H 缓冲液,复跳,工作 60 min 后停止实验。3 组鼠心取左心室前壁全层心肌组织分为两份,一份分别行 Bcl-2、Bax、p53 蛋白表达免疫组化染色及 TUNEL 检测;另一份用作 Western blot 检测组织中 Bcl-2 蛋白的表达。

1.2.3 TUNEL 检测心肌细胞凋亡 按试剂盒提示操作,正常心肌细胞核呈蓝色,而凋亡阳性心肌细胞核呈棕黄色。每只大鼠观察 4 张切片,每张切片在光学显微镜下计数 5 个高倍镜视野($\times 400$)中的凋亡阳性细胞核数/总细胞核数,取其平均值为心肌细胞凋亡率即凋亡指数(apoptosis index, AI)。

1.2.4 免疫组化检测心肌组织中 Bcl-2、Bax、p53 的蛋白表达 按试剂盒提示操作,每张切片随机计数 5 个高倍镜视野($\times 400$),应用 GD-8 型病理影像多媒体图文操作系统进行图像分析,测定阳性细胞核或胞浆的平均光密度(Optical density, OD 值)与阳性细胞百分比,计算蛋白阳性表达指数(Protein expression index, PEI)。PEI = OD 值 $\times$ (阳性细胞数/总心肌细胞数) $\times 100\%$ 。

1.2.5 Western-blot 检测心肌组织中 Bcl-2 的蛋白表达 ①操作步骤:组织蛋白质提取 $\rightarrow$ 总蛋白定量 $\rightarrow$ 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE 电泳) $\rightarrow$ 蛋白质的电转印 $\rightarrow$ 蛋白质的 Western 印迹杂交 $\rightarrow$ 化学发光试剂检测。②积分光密度值的测定:Western-blot 结果用 Bio-Rad 图象分析系统照相,美国 LabworksTM Analysis Software 公司的扫描分析软件系统行软件分析,以 Bcl-2 蛋白条带的积分光密度值/ β -actin 蛋白条带的

积分光密度值表示 Bcl-2 蛋白的相对蛋白含量。

1.3 统计学处理

所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)或中位数 $\pm$ 四分位数间距($M \pm Q$)表示,采用 SAS 8.0 进行统计分析,使用方差分析、 q 检验和非参数检验(秩和检验)。

2 实验结果

2.1 TUNEL 检测心肌组织中心肌细胞凋亡的改变

心肌组织经 TUNEL 染色,在基础组中偶见凋亡心肌细胞,见图 1-A。经过缺血再灌注后,心肌细胞凋亡数明显增多。与 TTX 组相比较,STH-2 组中凋亡细胞的数目更多,见图 1-B、1-C。心肌细胞凋亡指数基础组为(1.34 ± 0.23)%, TTX 组为(6.92 ± 1.10)%, STH-2 组为(11.20 ± 0.79)%,与基础组比较 TTX 组和 STH-2 组均有显著差异($P < 0.01$), TTX 组与 STH-2 组比较亦有显著差异($P < 0.01$)。

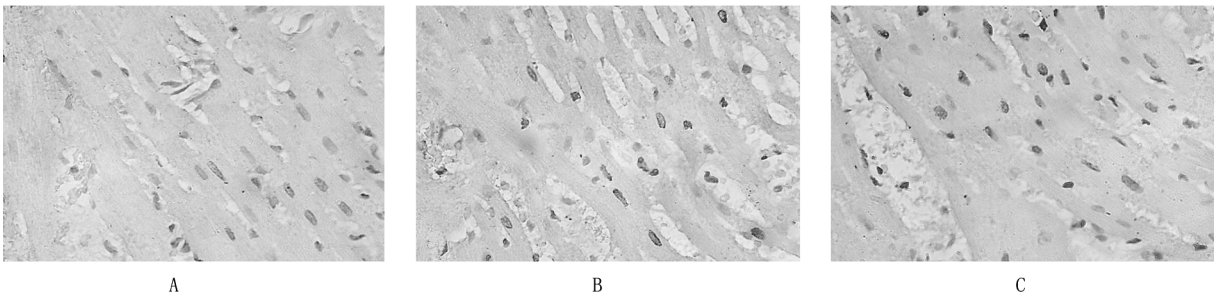


图 1 心肌细胞凋亡检测图

A - 基础组; B - TTX 组; C - STH-2 组

Fig 1 Photograph of apoptotic cardiomyocytes (TUNEL $\times 400$)

A - Base group; B - TTX group; C - STH-2 group

2.2 免疫组织化学检测心肌细胞凋亡相关蛋白表达结果

2.2.1 Bcl-2 蛋白 免疫组织化学染色后,基础组偶见 Bcl-2 蛋白阳性染色细胞,见图 2-A, STH-2 组的 Bcl-2 蛋白阳性染色的细胞增多,见图 2-B, TTX 组的

Bcl-2 阳性染色的细胞更多,见图 2-C。Bcl-2 蛋白的 PEI 基础组为(2.52 ± 0.58)%, STH-2 组为(13.51 ± 0.67)%, TTX 组为(22.63 ± 1.10)%,与基础组比较 TTX 组和 STH-2 组均有显著差异($P < 0.01$), TTX 组与 STH-2 组比较亦有显著差异($P < 0.01$)。

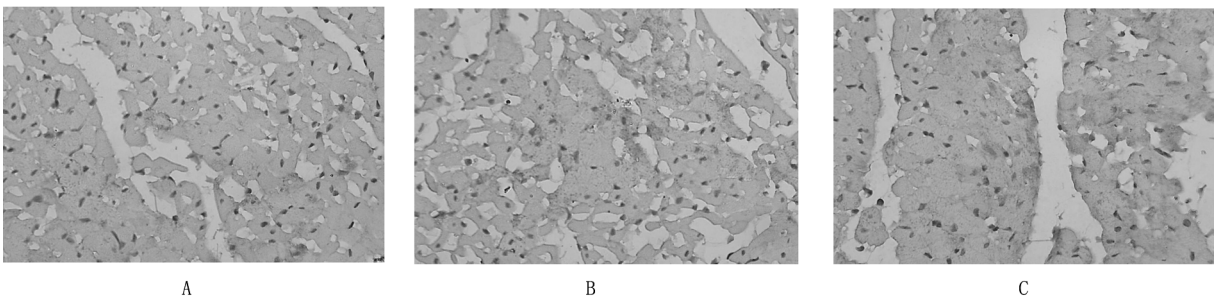


图 2 Bcl-2 蛋白表达(免疫组化染色 $\times 400$)

A - 基础组; B - STH-2 组; C - TTX 组

Fig 2 Expression of Bcl-2 protein in base group (Immunohistochemical staining $\times 400$)

A - Base group; B - STH-2 group; C - TTX group

2.2.2 Bax 蛋白 免疫组织化学染色后,基础组偶见 Bax 蛋白阳性染色细胞,见图 3-A,TTX 组的 Bax 蛋白阳性染色的细胞增多,见图 3-B,STH-2 组的 Bax 阳性染色的细胞更多,见图 3-C。Bax 蛋白的

PEI 基础组为 $(2.14 \pm 0.57)\%$,STH-2 组为 $(8.04 \pm 0.57)\%$,TTX 组为 $(6.05 \pm 0.46)\%$,分别与基础组比较,TTX 组和 STH-2 组均有显著差异 ($P < 0.01$); TTX 组与 STH-2 组比较亦有显著差异 ($P < 0.01$)。

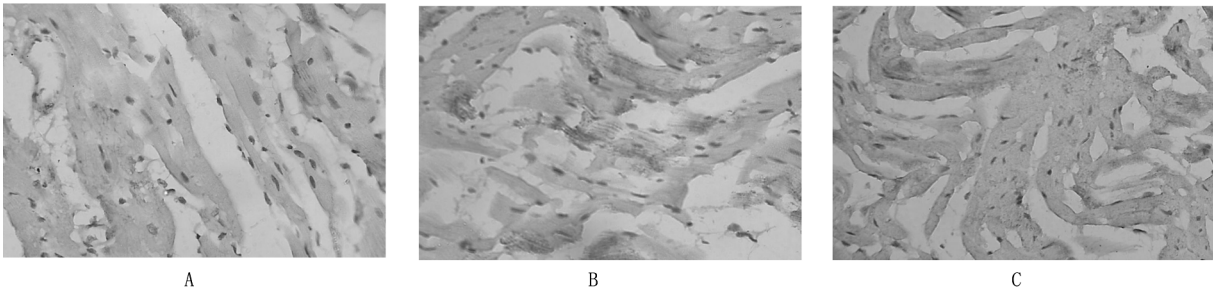


图 3 Bax 蛋白表达(免疫组化染色 $\times 400$)

A - 基础组; B - TTX 组; C - STH-2 组

Fig 3 Expression of Bax protein in base group(Immunohistochemical staining $\times 400$)

A - Base group; B - TTX group; C - STH-2 group

2.2.3 Bcl-2/Bax 比值 Bcl-2/Bax 蛋白表达的比值基础组为 1.19 ± 0.08 ,STH-2 组为 1.75 ± 0.15 ,TTX 组为 3.78 ± 0.41 。TTX 组和 STH-2 组与基础组比较,均有显著差异 ($P < 0.01$); TTX 组与 STH-2 组比较亦有显著差异 ($P < 0.01$)。

2.2.4 p53 蛋白 所有组别的切片经免疫组织化学染色后均未见 p53 蛋白的阳性表达。

2.3 Western blot 检测心肌细胞中 Bcl-2 蛋白表达结果

TTX 组和 STH-2 组中 Bcl-2 蛋白的相对蛋白含量分别为 $(86.1 \pm 0.98)\%$ 、 $(53.2 \pm 1.76)\%$ 均比基础组 $(23.7 \pm 2.61)\%$ 高,差异有显著性 ($P < 0.01$); 与 STH-2 组比较,TTX 组 Bcl-2 蛋白表达更多, ($P < 0.01$) 差异有显著性,见图 4。

3 讨论

细胞凋亡是组织细胞在正常生长发育过程中或在病理条件下的主动死亡过程,受细胞内基因的精确调控,是不同于细胞坏死的一种特殊的细胞死亡形式。心肌细胞凋亡是心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的主要形式。Raphael 等^[3]证实降低凋亡指数,减少心肌细胞凋亡是减轻 MIRI 的重要机制之一。参与细胞凋亡调控的蛋白很多,其中研究较多、功能明确的是抑制凋亡蛋白 Bcl-2,促进凋亡蛋白 Bax、p53。凋亡相关蛋白在 MIRI 所致细胞凋亡中发挥重要的调节作用。

TTX 能直接阻断心肌细胞 Na^+ 通道,使心肌细胞不能形成动作电位而导致心脏停搏时心肌细胞处于极化状态,较以往高 K^+ 去极化的停搏液(St. Thomas 液为代表)更接近生理,Chambers 等将此种停搏方式称作“极化停搏”。实验可见,同样经过缺血再灌注,TTX 组凋亡指数明显低于 STH-2 组,表明 TTX 能减少缺血再灌注损伤中心肌细胞的凋亡数量,抑制心肌细胞凋亡,从而有效减轻 MIRI。

凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的作用机制,可能以下几个方面:①直接的抗氧化作用。②阻止细胞色素 C(Cytc)从线粒体中的释放^[4]。③维持促凋亡成员在细胞内的定位分布,保护细胞不进入凋亡程序。④抑制凋亡蛋白酶(Caspases)的激活。⑤维持细胞钙稳态。⑥干扰某些细胞周期蛋白的细胞转运。⑦抑制促凋亡蛋白 Bax,Bak 的细胞毒作用。本实验中通过免疫组化染色和 Western blot 法都检测到 TTX 组心肌组织中 Bcl-2 蛋白的表达比 STH-2 组明显增

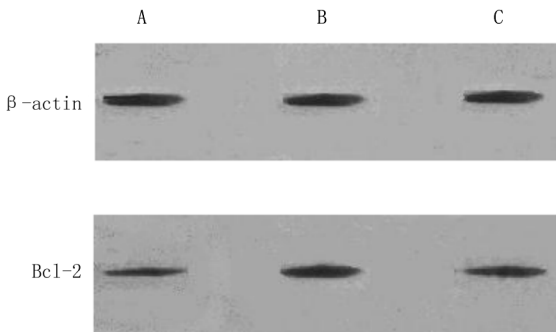


图 4 心肌细胞中 Bcl-2 蛋白表达(Western blot)

A - 基础组; B - TTX 组; C - STH-2 组

Fig 4 Expression of Bcl-2 protein in cardiomyocytes cell (Western blot)

A - Base group; B - TTX group; C - STH-2 group

多同时伴随着凋亡减少、MIRI 减轻。提示 Bcl-2 蛋白可能参与 TTX 心脏停搏液缺血再灌注模型中鼠心肌细胞凋亡的调控,TTX 的心肌保护作用可能是通过上调凋亡抑制蛋白 Bcl-2 从而抑制心肌细胞凋亡来实现的。

促进凋亡蛋白 Bax 蛋白由 192 个氨基酸残基组成,相对分子质量为 23.0×10^3 ,定位于细胞质。Hochhauser 等^[5]采用转基因技术,发现 Bax 基因敲除小鼠的离体心脏缺血 30 min 再灌注 120 min 后,用 TUNEL 法测得凋亡阳性细胞较对照组显著减少。本实验发现,TTX 组和 STH-2 组的 Bax 蛋白表达指数均高于基础组,表明心肌缺血再灌注损伤时 Bax 蛋白表达增多;但 TTX 组的 Bax 蛋白表达却明显低于 STH-2 组,显示 TTX 能抑制 Bax 蛋白表达,提示 TTX 保护心肌细胞的作用可能与下调 Bax 蛋白有关。

Diep 等^[6]在 SD 大鼠皮下注射心肌细胞凋亡诱导因子-血管紧张素 II,发现血管紧张素 II 使 Bcl-2/Bax 比值比正常对照组降低了两倍,同时增加了心肌细胞凋亡。实验发现与 STH-2 组比较,TTX 组 Bcl-2/Bax 的比值增高,心肌细胞凋亡减少。机制可能为:当 Bcl-2 高表达时,与 Bax 形成异源二聚体使 Bax 失活,抑制凋亡发生;当 Bax 表达增高时,Bcl-2 被磷酸化与 Bad 相结合,Bax 就从异源二聚体中释放出来,游离的 Bax 可以形成诱导细胞死亡的同源二聚体,当其易位到线粒体后破坏线粒体的功能,进而导致 Cyt c 及凋亡蛋白酶激活因子-1(Apaf-1)释放入胞浆,启动 Caspase 酶级联反应从而导致细胞凋亡。本研究再次证实凋亡终点事件的发生不仅与促进凋亡蛋白或抑制凋亡蛋白的表达密切相关,更重要的是依赖于抑制凋亡蛋白与促进凋亡蛋白的比值;同时表明 TTX 的心肌保护作用可能与提高 Bcl-2/Bax 比值从而减轻心肌细胞凋亡密切相关。

有报道 p53 蛋白在急性缺血或缺血再灌注的心肌细胞凋亡中起着重要作用^[7]。Venatapuram 等^[8]联合应用异氟醚与 p53 的抑制剂 α -pifithrin 明显减小缺血再灌注后兔心的心肌梗塞面积。本实验中各组心肌组织运用免疫组化染色均未检测到 p53 蛋白的明确表达,具体原因尚有待于进一步探讨。但与 Kawamura 等^[9]报道相符:基因改造的高表达 p300 基因的大鼠能对抗阿霉素所致心肌细胞凋亡及心衰,仅通过提高 Bcl-2 基因表达水平实现,而 p53 没

有变化。

综上所述:与传统的 STH-2 心脏停搏液比较,TTX 心脏停搏液能减少大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的数量,具有更好的心肌保护作用;TTX 心脏停搏液减轻心肌细胞凋亡可能是通过上调抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达,下调促进凋亡蛋白 Bax 表达,提高 Bcl-2/Bax 比值来实现。

REFERENCES

- [1] TAN S T, YANG S Q, YANG C K, et al. Protective effects of polarizing cardioplegia with Na(+) channel inhibitor in ex vivo rat heart preservation. [J]. Acad J First Med Coll PLA(第一军医大学学报),2005,25(10):1283-1289.
- [2] YANG C K, YANG S Q, TAN S T, et al. Tetrodotoxin cardioplegia solution alleviates intracellular calcium overload in rat cardiomyocytes[J]. Acta Acad Med Mil Tert(第三军医大学学报),2005,27(3):192-195.
- [3] RAPHAEL J, ABEDAT S, RIVO J, et al. Volatile anesthetic preconditioning attenuates myocardial apoptosis in rabbits after regional ischemia and reperfusion via akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006,318(1):186-194.
- [4] WANG C, NEFF D A, KROLIKOWSKI J G, et al. The influence of B-cell lymphoma 2 protein, an antiapoptotic regulator of mitochondrial permeability transition, on isoflurane-induced and ischemic preconditioning in rabbits[J]. Anesth Analg,2006,102(5):1355-60.
- [5] HOCHHAUSER E, KIVITY S, OFFEN D, 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.
- [6] DIEP Q N, EI MABROUK M, YUE P, et al. Effect of AT(1) receptor blockade on cardiac apoptosis in angiotensin II-induced hypertension[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2002,282(5):H1635-H1641.
- [7] HOFSETH L J, HUSSAIN S P, HARRIS C C. p53:25 years after its discovery[J]. Trends Pharmacol Sci,2004,25(4):177-181.
- [8] VENKATAPURAM S, WANG C, KROLIKOWSKI J G. Inhibition of apoptotic protein p53 lowers the threshold of isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in rabbits [J]. Anesthesia,2006,103(6):1400-1405.
- [9] KAWAMURA T, HASEGAWA K, MORIMOTO T, et al. Expression of p300 protects cardiac myocytes from apoptosis in vivo[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004,315(3):733-738.

收稿日期:2007-11-26