

• 论著 •

腺苷预处理对缺血-再灌注心肌细胞凋亡及核因子- κ B 表达的影响

张良清 徐军发 蔡康荣 李立志

【摘要】 目的 研究腺苷预处理对大鼠心肌细胞凋亡及核因子- κ B(NF- κ B)表达的影响。**方法** 制备缺血-再灌注损伤(I/R 组)和腺苷预处理(AP 组)的大鼠模型;采用原位缺口末端标记法(TUNEL)检测心肌细胞凋亡,免疫组织化学方法检测心肌组织 NF- κ B 表达。**结果** AP 组大鼠心肌细胞凋亡率[(2 635.0 $\pm$ 316.0)%]及心肌组织中 NF- κ B 表达[(33.21 $\pm$ 16.91)%]明显低于 I/R 组[(5 013.0 $\pm$ 503.7)%和(59.30 $\pm$ 10.36)%], $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$], 明显高于对照组,分别为(68.7 $\pm$ 50.3)%和(10.98 $\pm$ 4.65)%, P 均 < 0.01 。**结论** 腺苷预处理具有明显降低大鼠缺血-再灌注后心肌细胞凋亡的作用,可能与腺苷预处理可减轻缺血-再灌注心肌组织过度表达 NF- κ B 有关。

【关键词】 心肌; 缺血-再灌注; 腺苷预处理; 细胞凋亡; 核因子- κ B

中图分类号: R363.22; Q255 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-0603(2004)03-0158-03

Effects of adenosine preconditioning on cardiac myocyte apoptosis and expression of nuclear factor - κ B in ischemia/reperfusion rats ZHANG Liang - qing *, XU Jun - fa, CAI Kang - rong, LI Li - zhi.
* Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of adenosine preconditioning on cardiac myocyte apoptosis and the expression of nuclear factor - κ B(NF- κ B)during myocardial ischemia/reperfusion (I/R) in rats. **Methods** A model of I/R injury (I/R group) and pretreatment with adenosine (AP group) was reproduced in rats. The morphologic features of apoptosis were identified histochemically by TdT-mediated dUTP nick end (TUNEL) staining. Expression of NF- κ B in apoptosis myocardial cells was observed by immunohistochemical stain and image analysis. **Results** The percentage of cardiac myocyte apoptosis and the expression of NF- κ B in AP group were (2 635.0 $\pm$ 316.0)% and (33.21 $\pm$ 16.91)%, they were significantly lower than those in I/R group (5 013.0 $\pm$ 503.7)% and (59.30 $\pm$ 10.36)% respectively ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but higher than those in control group (68.7 $\pm$ 50.3)% and (10.98 $\pm$ 4.65)% respectively (both $P < 0.01$). **Conclusion** Adenosine preconditioning can protect from myocardial I/R injury and relieve cardiac myocyte apoptosis and expression of NF- κ B.

【Key words】 cardiac myocyte; ischemia/reperfusion; adenosine preconditioning; apoptosis; nuclear factor - κ B

CLC number: R363.22; Q255 **Document code:** A **Article ID:** 1003-0603(2004)03-0158-03

缺血预适应(ischemic preconditioning, IP)是心肌重要的内源性保护机制,但由于缺血的安全时限、个体差异等使其临床应用受限,所以寻找药物模拟 IP 效应(即药物性预适应)产生心肌保护作用引起了学者们的关注^[1,2]。腺苷预处理的心肌保护作用已在许多动物及人的实验中得到证实,但机制不甚清楚^[2,3]。我们在既往的研究中发现,腺苷预处理有平抑缺血-再灌注后的炎性反应的作用^[4],所以在本研究拟进一步观察腺苷预处理对大鼠心肌细胞凋亡及对核因子- κ B(NF- κ B)的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物模型制备:以质量分数为 20%的乌拉坦(1 g/kg)腹腔注射麻醉,以小动物呼吸机行机械通气。将针形电极插入四肢皮下,连接心电图机,记录标准 II 导联心电图。开胸暴露心脏,在左冠状动脉前降支距左心耳下缘 2 mm 处穿过丝线,提起后以套管夹闭造成冠状动脉阻塞。心肌缺血依据心电图 ST 段抬高且有节段性运动不良加以确认;再灌注依靠 ST 段恢复加以确认。手术结束后输入液体,控制 30 min 后开始实验。

1.2 动物分组及处理:24 只雄性清洁级 SD 大鼠(广东医学院动物中心提供),体质量(250 $\pm$ 30)g,随机分为 3 组,每组 8 只。假手术组(C 组);缺血-再灌注组(I/R 组);缺血 30 min、再灌注 120 min;腺苷预

基金项目:广东省湛江市科技攻关基金资助项目(20018312)

作者单位:524001 湛江,广东医学院附属医院麻醉科

作者简介:张良清(1970-),男(汉族),湖北省人,医学硕士,主治医师。

处理组(AP 组):缺血前泵注腺苷 1 mg/kg, 30 min 内滴完,而后重复缺血-再灌注组实验。再灌注完毕后将大鼠处死,迅速取心脏病变部位心肌标本置于体积分数为 10%的甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋和切片,以备组织学检查。

1.3 心肌细胞凋亡检测:按常规病理组织学方法制备心肌石蜡标本。原位缺口末端标记法(TUNEL)检测,步骤按试剂盒(武汉博士德分装)推荐的方法进行。TUNEL 阳性反应为细胞核呈棕褐色或棕黄色颗粒,细胞核呈 TUNEL 阳性反应且具备细胞凋亡的形态学特征者被判定为凋亡细胞。在每张玻片上随机取 10 个区域,每个区域计数 100 个凋亡阳性细胞数,然后加在一起即可得到凋亡细胞的阳性率。

1.4 心肌组织 NF- κ B 的活化及免疫组织化学(组化)检测:按链酶亲和素-过氧化物酶复合物(SABC)即用型免疫组化染色(SP)试剂盒(武汉博士德)说明书操作,取石蜡片按程序脱蜡,体积分数为 3%的 H_2O_2 灭活内源性酶,微波抗原修复,正常山羊血清封闭,加入羊抗 NF- κ B p65 多克隆抗体(美国 Santa Cruz BioTech 公司)一抗,稀释度为 1:80,冰箱中过夜后加山羊抗鼠 IgG,加酶标记物,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,光镜下观察。应用 Leica 图像分析系统,光学显微镜放大 400 倍摄取图像,输入图像分析系统内。每张切片随机选取 10 个区域,计算每个区域中染色部分占整个区域面积的百分比,以均值表示每个心肌中阳性信号面积。

1.5 统计学方法:实验结果以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,统计分析采用 SPSS10.0 软件进行方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 凋亡细胞计数:C 组、I/R 组和 AP 组的心肌细胞凋亡率分别为 $(68.7\pm 50.3)\%$ 、 $(5013.0\pm 503.7)\%$ 和 $(2635.0\pm 316.0)\%$ 。I/R 和 AP 组心肌细胞凋亡率明显高于 C 组(P 均 <0.01),而 AP 组大鼠心肌细胞凋亡率明显低于 I/R 组($P<0.05$)。

2.2 腺苷预处理对 I/R 大鼠心肌细胞 NF- κ B 表达的影响:正常的 C 组大鼠心肌组织有少量量的 NF- κ B 表达 $[(10.98\pm 4.65)\%$, 图 1];I/R 组大鼠心肌组织中 NF- κ B 的表达显著上调 $[(59.30\pm 10.36)\%$, $P<0.01$, 图 2];但 AP 组大鼠心肌组织中 NF- κ B 表达明显低于 I/R 组 $[(33.21\pm 16.91)\%$, $P<0.01$, 图 3]。

3 讨论

腺苷作为机体一种重要的内源性活性物质,研

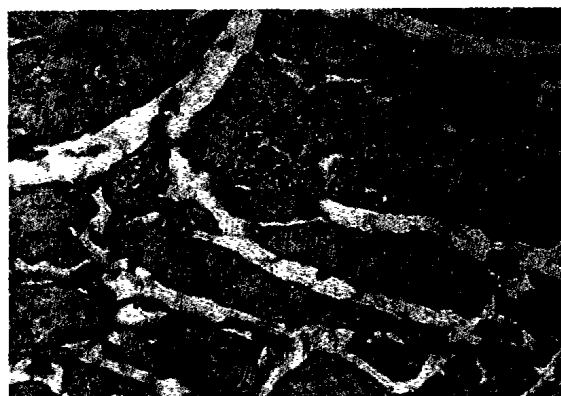


图 1 C 组 NF- κ B 表达较弱(SABC, $\times 400$)

Fig. 1 Expression of NF- κ B in control group(SABC, $\times 400$)

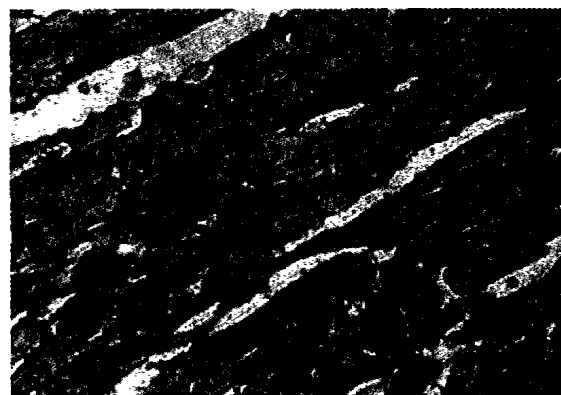


图 2 I/R 组 NF- κ B 表达明显增强(SABC, $\times 400$)

Fig. 2 Expression of NF- κ B in I/R group(SABC, $\times 400$)



图 3 AP 组 NF- κ B 表达减弱(SABC, $\times 400$)

Fig. 3 Expression of NF- κ B in AP group(SABC, $\times 400$)

究已证实它可模拟缺血预处理效应而产生心肌保护作用^[3-5]。有研究报道认为,缺血预处理早期可减少缺血-再灌注损伤的部分原因来自于缺血预处理能降低缺血-再灌注时造成的心肌细胞凋亡^[6]。因此,是否可以说,腺苷预处理是通过降低缺血-再灌注时心肌细胞的凋亡从而产生心肌保护作用的。本研究发现,与对照组相比,虽然 I/R 组和 AP 组的心肌细胞凋亡率明显升高,但 AP 组心肌细胞凋亡率却明显低于 I/R 组。可见腺苷预处理产生心肌保护作用

有可能是由于降低了心肌再灌注损伤时心肌细胞凋亡所致。

NF- κ B 是一种具有基因转录多向调控作用的转录因子。近年研究表明, NF- κ B 亦存在于心肌细胞中, 参与心肌缺血-再灌注导致的心肌的炎症反应、凋亡、坏死、心功能下降等心血管疾病的发生、发展^[7]。Li 等^[8]观察心肌缺血-再灌注大鼠模型时发现, 缺血 4 min 后核抑制因子- α (I κ B- α) 蛋白即显著下降, 缺血 10 min 后才开始逐渐恢复, 而 NF- κ B 活化相应从第 5 min 开始持续增高, 心肌再灌注则进一步放大缺血所致的 NF- κ B 激活效应。Bach 等^[9]研究发现, NF- κ B 的活化除引起炎症、免疫性的细胞因子表达外, 还可接着产生一些抗炎和抗细胞凋亡的蛋白, 如 Bcl-2 家族、内源性的抗氧化剂等。缺血预适应时激发的轻度氧化应激致 NF- κ B 活化会引起这些细胞保护性蛋白的表达, 在随后的缺血-再灌注过程中, 这些蛋白反过来通过抑制 NF- κ B 的活化, 减轻或消除由 NF- κ B 所介导的心肌损伤。本研究发现, 正常大鼠心肌组织有少量量的 NF- κ B 的表达, 缺血-再灌注 120 min 后大鼠心肌组织中 NF- κ B 的表达显著上调, 而在缺血-再灌注 120 min 时, 腺苷预处理大鼠心肌组织中 NF- κ B 表达则明显低于缺血-再灌注组。因而推测腺苷预处理具有减少心肌缺血-再灌注后 NF- κ B 过度表达作

用, 从而减轻心肌缺血-再灌注后细胞凋亡发生。

参考文献:

- 1 Gross G J, Auchampach J A. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dog [J]. Circ Res, 1992, 70: 223.
- 2 Kitakaze R B, Hori M. Ischemic preconditioning increases adenosine release and 5'-nucleotidase activity during myocardial ischemia and reperfusion in dog [J]. Circulation, 1993, 87: 208.
- 3 Forman M B, Velasco C E, Jackson E. Adenosine attenuates reperfusion injury following regional myocardial ischemia [J]. Cardiovasc Res, 1993, 27: 29.
- 4 车玉英, 贾国良, 陈士良. 缺血预处理和“腺苷预处理”对兔心肌梗死面积的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 1997, 9(9): 514-516.
- 5 张良清, 李立志, 邵义明, 等. 腺苷预处理对体外循环下瓣膜置换术患者围术期炎症反应的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(4): 217-219.
- 6 Xuan Y T, Tang X L, Bangerjce S, et al. Nuclear factor κ B play an essential role in the phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits [J]. Circ Res, 1999, 84(5): 1095-1109.
- 7 刘振桐. 核因子- κ B 与全身炎症反应综合征 [J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(10): 631-632.
- 8 Li C, Browder W, Kao R L. Early activation of transcription factor NF- κ B during ischemia in perfusion rat heart [J]. Am J Physiol, 1999, 276: H543-H552.
- 9 Bach F H, Hancock W W, Ferran C. Protective gene expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury [J]. Immunol Today, 1997, 18: 483-486.

(收稿日期: 2003-08-09 修回日期: 2004-02-23)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

欢迎订阅 2004 年《中国危重病急救医学》杂志和《中国中西医结合急救杂志》

《中国危重病急救医学》杂志系中华医学会和天津市天和医院联合主办的中华医学会系列杂志, 是我国急救医学界权威性学术期刊。本刊为月刊, 每月 10 日出版, 国际通用 16 开大版本, 内文用 80 克铜版纸印刷, 内容丰富, 且适合各种病理图片印刷。为便于广大作者投稿, 当年各期上刊登有重点内容安排。作者可根据各期重点, 提前 6 个月投稿, 以提高文稿的编审速度。欢迎广大读者到当地邮局办理 2004 年的订阅手续。邮发代号: 6-58; 定价: 7.8 元/期, 全年 93.6 元。

《中国中西医结合急救杂志》系中国中西医结合学会主办、天津市天和医院承办的全国性杂志(为中国中西医结合学会系列杂志之一, 由《中西医结合实用临床急救》杂志更名), 是我国中西医结合急救医学界权威性学术期刊, 已进入国内外多家权威性检索系统。本刊为双月刊, 64 页, 国际通用 16 开大版本, 80 克双胶纸印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理 2004 年的订阅手续, 邮发代号: 6-93, 定价: 6.9 元/期, 全年 41.4 元。

订阅上述两刊的读者如果遇有期刊装订错误, 请将刊物寄回编辑部调换, 我们将负责免费邮寄新刊。

《中国危重病急救医学》杂志和《中国中西医结合急救杂志》已经进入俄罗斯《文摘杂志》(AJ of VINITI)、“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据网络系统(China Info)”、“中文科技期刊数据库”和“em120.com 危重病急救在线”。同时《中国危重病急救医学》杂志还进入美国《MEDLINE》;《中国中西医结合急救杂志》还进入国家中医药管理局“中国传统医药信息网”, 网址为 <http://www.Medicine.China.com>。投两刊论文作者需对两刊以上述方式使用论文无异议, 并由全部作者或由第一作者全权代表其他作者在版权转让协议和校稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清, 不同意者论文可不投本刊。期刊设有各种栏目, 欢迎广大作者踊跃投稿。地址: 天津市和平区睦南道 122 号天和医院内; 邮编: 300050。

(期刊编辑部)