

网络出版时间:2016-3-8 8:29:01 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160308.0829.010.html

瘦素预处理经线粒体通路对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响

王文艳^{1,2},徐彤彤²,戴春光³,白 淮⁴

摘要 目的 探讨在SD大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)中瘦素预处理经线粒体信号通路对机体的影响及相关机制。方法 选取健康雄性成年SD大鼠50只,随机分为缺血再灌注(IR)模型对照组(模型组,线栓法制作大鼠IR模型)、假手术组(仅开胸不作血管结扎)、IR瘦素预处理低、中、高剂量(20、50、100 μg/kg)共5组,每组10只。各组大鼠经缺血半小时再灌注24 h,观察心肌HE染色病理形态学变化;ELISA法检测血清中白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和线粒体通透性转换孔(mPTP)的含量;Western blot法检测凋亡蛋白B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)、凋亡相关基因(Bax)的表达。结果 与模型组比较,假手术组及瘦素预处理组心肌病理学表现减轻,IL-6、TNF-α、mPTP及Bax表达显著降低($P < 0.05$),Bcl-2在瘦素预处理组中表达显著增高,且在瘦素高剂量组中表达最高($P < 0.05$),均无明显剂量依赖性。结论 瘦素可缓解MIRI的炎症反应及mPTP的开放,并促进线粒体通路相关蛋白Bcl-2上调,使Bax蛋白的表达下调,从而保护心肌细胞减轻损伤。

关键词 瘦素预处理;心肌缺血再灌注损伤;线粒体通路

中图分类号 R 541.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)04-0481-04

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)时所释放的损伤因子对线粒体产生破坏,促使线粒体变形、破损、基质外流,导致线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)的开放增多及相关凋亡蛋白如B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、凋亡相关基因(Bax)等的释放,从而对机体造成损

伤^[1]。近年来mPTP与MIRI之间的关系已成为各学者的研究热点。瘦素已被证实与MIRI之间存在着重要的联系,但瘦素在MIRI中对线粒体通路的影响尚需要进一步研究^[2]。该研究旨在建立大鼠心肌缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)模型,并术前予以不同剂量瘦素进行处理,观察心肌组织病理情况,并测定血清白介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)及mPTP的变化及心肌Bcl-2、Bax的表达,为改善MIRI提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 实验对象 SD成年雄性大鼠50只,约250 g,购自桂林医学院实验动物房。将50只大鼠随机分为IR模型对照(模型组)、假手术组、IR瘦素低剂量预处理(低剂量组)、IR瘦素中剂量预处理(中剂量组)、IR瘦素高剂量预处理(高剂量组),每组各10只。

1.2 主要试剂和仪器 重组大鼠瘦素(美国R&D Systems公司);IL-6和TNF-α酶联免疫试剂盒(北京奥博森生物科技有限公司);mPTP酶联免疫试剂盒(上海铭睿生物科技有限公司);Bcl-2、Bax及GAPDH抗体(中国万类生物公司)。仪器包括低温及高速离心机、小动物专用呼吸机、动物心电图仪、超低温冰箱、电泳仪、转膜仪、Leica正置显微镜、酶标仪等。

1.3 方 法

1.3.1 MIRI模型的制备 各组大鼠术前禁食禁饮12 h, MIRI模型的制备采用线扎大鼠的冠状动脉左前降支。瘦素预处理组在术前30 min按浓度分组进行腹腔注射重组大鼠瘦素,予以浓度3 mg/kg水合氯醛腹腔注射进行麻醉后将大鼠固定于手术台上,四肢接动物心电图仪,观察术前心电图II导联变化。取颈部及胸前区进行备皮,作颈部竖切口,钝性分离颈部肌肉暴露气管,用蝶形静脉留置针刺入气管并拔出针芯后接小动物专用呼吸机(呼吸频率60次/min,呼吸比2:1,潮气量约16 ml),监测心电图稳定后进行开胸结扎冠状动脉左前降支。胸部作胸

2015-12-21 接收

基金项目:桂林市科学研究与技术开发计划课题(编号:20130120-1);广西医疗卫生适宜技术与开发课题(编号:S201316-03);广西科学研究与技术开发计划项目(编号:桂科能1598025-29)

作者单位:¹桂林医学院研究生院,桂林 541004

桂林医学院附属医院²特需病区³重症医学科,桂林 541001

⁴株洲市中心医院重症医学科,株洲 412000

作者简介:王文艳,女,硕士研究生;

徐彤彤,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: xutongtongguilin@163.com

骨左缘竖形切口,钝性分离胸前区肌肉及第2~3肋骨间隙,暴露心脏。使用眼科镊提起心包膜,剪破心包膜并使用小拉钩分离心包膜于切口两侧,用湿棉签轻压心脏向前右旋转至可见左心耳。于左心耳下约2 mm处使用无创小圆针在左前降支血管处进针,深度约1 mm,留置硅胶管后留线结扎。心肌缺血模型成功标志:肉眼可见所扎血管心肌部分颜色改变为暗红、苍白或肿胀,心电图Ⅱ导联可见心率较前减慢或出现心律失常,并可见ST段较前明显抬高。缺血30 min后,拔出硅胶管,留线缝合胸壁及胸前皮肤。假手术组仅穿针过冠状动脉左前降支留线不进行结扎。

1.3.2 心肌组织病理切片 取部分左心室肌,用冰生理盐水冲洗后于10%多聚甲醛溶液固定,并石蜡包埋、切片、HE染色,最后于Leica正置显微镜下观察各组心肌的病理学变化。

1.3.3 ELISA法检测血清中IL-6、TNF-α及mPTP的表达 再灌注后取各组大鼠股动脉血约5 ml于肝素抗凝管中,置低温离心机中以3 000 r/min离心5 min,分离血清于EP管中,并置于-80℃冰箱保存待测,各组检测均严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.3.4 Western blot法检测心肌中Bcl-2和Bax蛋白表达的变化 取超低温冰箱下冻存心肌60 mg捣碎后提取每组心肌组织总蛋白,应用BCA法进行蛋白定量,以每泳道20 μg上样量进行SDS-PAGE电泳,转膜仪将蛋白转上PVDF膜,常温下封闭1 h,加Bcl-2和Bax(1:1 000稀释)一抗,4℃孵育过夜后使用TBST洗膜,按1:10 000稀释相应二抗,室温孵育1 h再使用TBST洗膜后,用化学发光法显影检测目的蛋白的表达水平。

1.4 统计学处理 应用SPSS 18.0软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较使用单因素方差分析。

2 结果

2.1 心肌组织HE染色 假手术组HE染色显示心肌纤维排列规整,呈束状,无红细胞渗出及炎症细胞浸润;模型组再灌注后可见心肌纤维排列紊乱,部分胞核消失,出现大量泡沫细胞及红细胞渗出,有炎症细胞浸润现象;瘦素处理组与模型组比较,可见泡沫细胞减少,心肌纤维排列紊乱减轻,组织间质增宽,但红细胞渗出少。见图1。

2.2 血清IL-6、TNF-α及mPTP的表达 与假手

术组比较,余4组IL-6、TNF-α、mPTP水平均表达升高($P < 0.05$);与模型组比较,瘦素预处理组IL-6、TNF-α、mPTP水平均降低($P < 0.05$),无剂量依赖性表现。见表1。

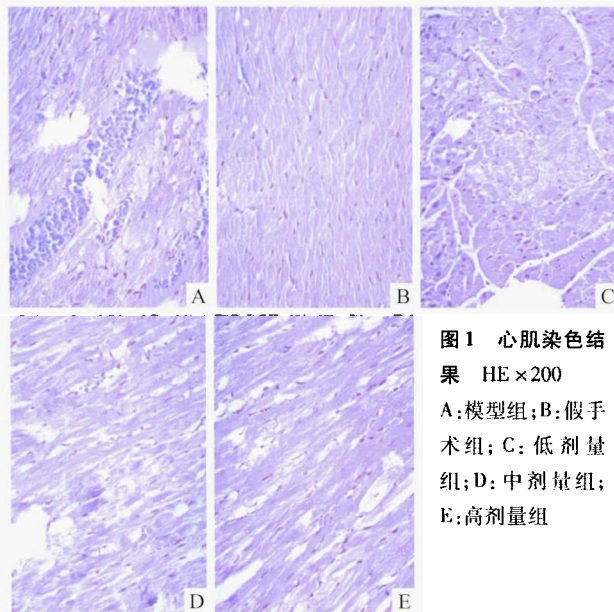


图1 心肌染色结果 HE×200
A:模型组;B:假手术组;C:低剂量组;D:中剂量组;E:高剂量组

表1 血清IL-6、TNF-α、mPTP水平改变(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)	mPTP (pg/ml)
模型	74.53 ± 3.39 [#]	81.43 ± 3.49 [#]	0.54 ± 0.05 [#]
假手术	20.13 ± 1.96	6.71 ± 0.80	0.070 ± 0.006
低剂量	46.77 ± 2.27 ^{*#}	44.93 ± 5.09 ^{*#}	0.32 ± 0.02 ^{*#}
中剂量	54.77 ± 4.05 ^{*#}	62.17 ± 3.68 ^{*#}	0.38 ± 0.02 ^{*#}
高剂量	40.10 ± 1.48 ^{*#}	31.67 ± 3.07 ^{*#}	0.24 ± 0.05 ^{*#}
F值	152.48	198.68	78.51

与模型组比较: * $P < 0.05$;与假手术组比较: [#] $P < 0.05$

2.3 心肌组织中Bcl-2和Bax的表达 与假手术组比较,低剂量组及高剂量组Bcl-2表达上调($P < 0.05$),Bax在模型组及瘦素处理组中表达均上调;与模型组比较,Bcl-2在瘦素处理组中表达显著上调,且在瘦素高剂量组中表达最高($P < 0.05$);Bax在瘦素预处理中表达显著下调,且在瘦素高剂量组中表达最低($P < 0.05$),均无明显剂量依赖性。见图2。

3 讨论

研究^[3-4]表明MIRI与细胞凋亡有重要的联系,并发现线粒体功能的改变与细胞凋亡紧密相关,如线粒体释放相关凋亡蛋白、氧自由基产生过多、胞质钙离子失衡等。在再灌注期会发生大量mPTP开放,因而在MIRI中mPTP对相关凋亡蛋白等因子的

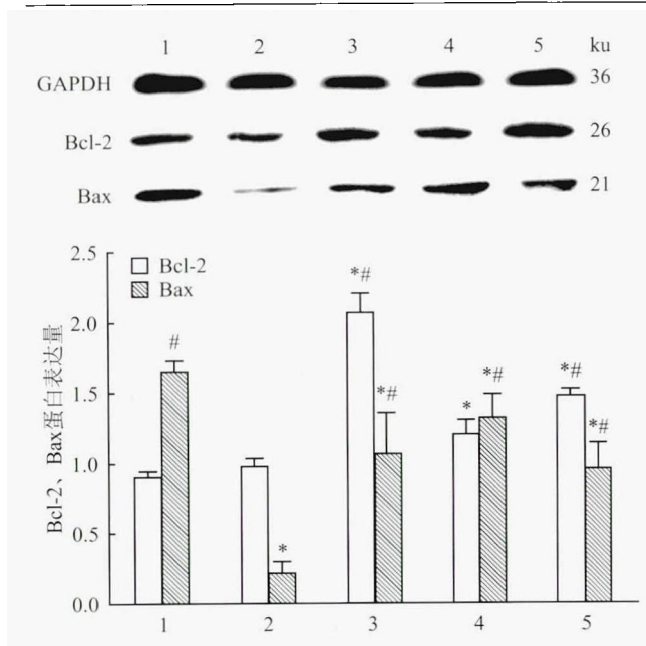


图2 各组大鼠心肌组织中 Bcl-2、Bax 蛋白的表达水平 ($n=10, x \pm s$)

1:模型组;2:假手术组;3:低剂量组;4:中剂量组;5:高剂量组;
与模型组比较: * $P < 0.05$; 与假手术组比较: # $P < 0.05$

释放起着关键作用^[5]。线粒体通路引发的凋亡主要与 Bcl-2 和 Bax 蛋白有关, Bax 是 Bcl-2 的同源二聚体, 两者均表达于线粒体外膜、内质网膜、核膜。正常状态下, 当机体出现损伤时, Bcl-2 可介导聚集核内谷胱甘肽, 抵消氧自由基的产生, 并阻断钙离子通道对细胞进行保护, 相反, Bax 表达增高可促进细胞凋亡^[6-7]。

瘦素与大鼠或小鼠 MIRI 存在密切联系, 在 MIRI 中, 经瘦素处理后影响超氧化物歧化酶 1 (SOD1)、丙二醛 (MDA)、IL-6、TNF- α 等因子, 通过减轻炎症反应及氧化应激损伤对机体进行保护^[8-9]。研究^[10]显示磷脂酰肌醇 3 激酶/丝氨酸 (苏氨酸) 蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路参与 MIRI 的调控, 而 Bcl-2/Bax 是 PI3K/Akt 的下游信号蛋白, 均参与线粒体通路, 瘦素也被证实与 PI3K/Akt 信号通路有着密切联系。

本研究在制作大鼠 MIRI 模型的前提下探讨瘦素预处理经线粒体通路对大鼠 MIRI 的影响, 结果显示瘦素预处理组心肌病理学表现较模型组缓解, 血清中炎症因子 IL-6、TNF- α 及 mPTP 表达降低, 表明瘦素减轻了炎症反应并阻止了 mPTP 的开放, 且促凋亡蛋白 Bax 表达下调, 而抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达上调, 从而显示瘦素可能经线粒体通路对大鼠 MIRI 起到了保护作用, 但其相关机制的信号蛋白仍需进一步探究。

参考文献

- [1] Halestrap A P, Clarke S J, Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1767(8): 1007-31.
- [2] McGaffin K R, Witham W G, Yester K A, et al. Cardiac-specific leptin receptor deletion exacerbates ischaemic heart failure in mice [J]. Cardiovasc Res, 2011, 89(1): 60-71.
- [3] Lee G H, Lee H Y, Li B, et al. Bax inhibitor-1-mediated inhibition of mitochondrial Ca^{2+} intake regulates mitochondrial permeability transition pore opening and cell death [J]. Sci Rep, 2014, 4: 5194.
- [4] Smith R A, Hartley R C, Murphy M P. Mitochondria-targeted small molecule therapeutics and probes [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(12): 3021-38.
- [5] 崔花花, 吴黎明. 线粒体线粒体通透性转换孔与心肌缺血预处理 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2006, 6(5): 300-2.
- [6] 朱海萍, 董莉, 陈成水. 线粒体通透性转换孔与细胞凋亡的最新研究进展 [J]. 医学综述, 2010, 16(13): 1921-3.
- [7] Bernardi P, Rasola A, Forte M, et al. The mitochondrial permeability transition pore: channel formation by F-ATP synthase, integration in signal transduction, and role in pathophysiology [J]. Physiol Rev, 2015, 95(4): 1111-55.
- [8] 吕祥威, 徐彤彤, 武琦, 等. 瘦素预处理对小鼠心肌冷/热缺血再灌注损伤的差异性 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(20): 4436-7.
- [9] 余帆, 徐彤彤, 吕祥威, 等. 瘦素预处理对 2 型糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2013, 39(6): 1219-23.
- [10] 任晓娟, 颜光涛. 瘦素与细胞凋亡 [J]. 标记免疫分析与临床, 2007, 14(2): 126-8.

Effects of leptin pretreatment *via* mitochondrial pathway on myocardial ischemia reperfusion injury in rats

Wang Wenyan^{1,2}, Xu Tongtong², Dai Chunguang³, et al

(¹ Graduate School of Guilin Medical University, Guilin 541004;

² Special Wards, ³ ICU, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001)

Abstract Objective To investigate the effect and relevant mechanism of leptin pretreatment *via* mitochondrial

模拟微重力对猕猴肺组织趋化因子 CCL20 及其受体 CCR6 表达的影响

许崇玉¹,王萍¹,陈杨²,朱敏立²,司少艳³,蔡艺灵⁴,马华松⁵,陈志明⁵

摘要 目的 探讨模拟微重力对猕猴肺组织 CC 亚族趋化因子配体 20(CCL20)及趋化因子受体 6(CCR6)mRNA 和蛋白表达的影响。方法 15 只猕猴分为 3 组,每组 5 只:对照组、模拟组、恢复组。HE 观察猕猴肺组织结构,实时荧光定量 PCR、免疫组化法检测肺组织中 CCL20 及 CCR6 mRNA 和蛋白表达。结果 模拟组和恢复组猕猴肺组织可见肺泡间隔增厚,肺间质内及支气管旁可见淋巴细胞浸润,恢复组较模拟组减轻。模拟组、恢复组 CCL20 mRNA 的表达水平较对照组增高,但差异无统计学意义。模拟组 CCR6 mRNA 的表达水平较对照组、恢复组显著增高($P < 0.01$)。模拟组 CCL20 及 CCR6 蛋白表达较对照组、恢复组显著升高($P < 0.05$)。结论 中、长期模拟微重力可引起肺组织结构破坏、淋巴细胞浸润,并可引起猕猴肺组织中 CCL20 及 CCR6 表达增强。

关键词 模拟微重力;猕猴;肺组织;CCL20;CCR6

中图分类号 R 563.9;V 7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)04-0484-05

2016-01-18 接收

基金项目:总装备部试验技术研究重点项目(编号:SMFA13K02)

作者单位:¹安徽医科大学解放军 306 临床学院,北京 100101

解放军第 306 医院²呼吸与危重症学科、³特种医学实验研究中心、⁴神经内科、⁵骨科,北京 100101

作者简介:许崇玉,男,硕士研究生;

王萍,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: ping-wang306hpbj@163.com

随着我国载人航天事业的深入发展,空间环境中机体防护显得尤为重要。由于肺自身特点,导致其对重力变化极其敏感^[1]。研究^[2]表明,失重可导致肺组织结构病理损伤并伴有细胞因子的变化。CCL20 是近期发现的趋化因子,与其唯一同源性受体 CCR6^[3]结合,可诱导多种淋巴细胞迁移,在炎症损伤和免疫应答中发挥重要作用^[4]。研究^[5-6]表明 CCL20/CCR6 可参与多种肺组织疾病,促进气道炎症的发生和发展。汤楚华等^[7]发现,模拟失重可引起猕猴牙龈组织 CCL20 和 CCR6 表达增加,在牙龈组织应激过程中发挥作用。然而,目前国内外未见失重状态下 CCL20/CCR6 在肺组织中相关作用的报道。该研究以猕猴为对象,采用模拟微重力模型^[8],观察失重对肺组织结构及 CCL20、CCR6 mRNA 和蛋白表达的影响,为进一步研究空间环境下肺组织结构及功能变化提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂和动物模型

1.1.1 主要试剂 一抗为山羊抗人 CCL20 多克隆抗体、鼠抗人 CCR6 单克隆抗体(美国 R&G 公司);二抗为抗兔/抗鼠通用型免疫组化试剂盒(丹麦 Dako 公司);山羊超敏二步法检测试剂盒(北京中杉

signaling pathway on myocardial ischemia-reperfusion injury in SD rats. **Methods** 50 healthy male adult SD rats were randomly divided into 5 groups, model group(to make ischemia-reperfusion model by suture method), sham group(thoracotomy without vascular ligation), the low, medium and high dose leptin pretreatment groups(20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n = 10$). After ischemia for 30 minutes and reperfusion for 24 hours, then to observe the pathological changes of cardiac HE staining in rats; using ELISA to test serum interleukin-6 (IL-6), tumor-stimulating factor- α (TNF- α) and mitochondrial permeability transition pore (mPTP); to test the expression of Bcl-2 and Bax apoptotic proteins by Western blot method. **Results** Compared with the model group, pathological characteristics of sham group and leptin preconditioning groups were improved; IL-6, TNF- α , mPTP and Bax expression was significantly decreased ($P < 0.05$); in leptin pretreatment groups, Bcl-2 expression was significantly increased, especially in high dose leptin group($P < 0.05$), and there was no obvious dose-dependence. **Conclusion** Leptin relieve inflammation and inhibit mPTP, up-regulate the expression of Bcl-2 and down-regulate the Bax, thereby protect cardiomyocytes and mitigate damage on MIRI.

Key words leptin pretreatment; myocardial ischemia reperfusion injury; mitochondrial pathway