

· 基础研究 ·

猪缺血再灌注损伤与心肌细胞凋亡的实验研究*

孙海梅¹, 郭涛², 王雨平¹, 唐睿珠³, 骆志玲², 申丽娟⁴

(昆明医学院第一附属医院:1. ICU;2. 心内科,昆明 650031;3. 昆明医学院第一附属医院临床医学试验中心,昆明 650032;4. 昆明医学院病理教研室,昆明 650031)

摘要:目的 探讨猪心肌梗死不同区域细胞凋亡的分布。方法 滇南小耳猪 10 只,随机分为两组,每组 5 只。(1)假手术组(S组),在 X 线的监控下,经右股动脉置入冠状动脉球囊导管至左前降支,不行冠脉封堵心肌缺血;(2)缺血再灌注组(I/R组),冠脉球囊扩张阻断冠脉血流 60 min 致心肌缺血,撤除球囊恢复冠脉灌注。再灌注 72 h,行猪心肌末端标记法(TUNEL 法)检测凋亡细胞及免疫组化法检测 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达。结果 再灌注后 72 h,S 组未发生心肌梗死及心肌细胞凋亡,I/R 组在心肌梗死区、边缘区、非梗死区的心肌组织均存在细胞凋亡现象,梗死区和边缘区的心肌细胞凋亡指数(AI)明显高于非梗死区,且相应区域的 Bax 蛋白表达及 Bax/Bcl-2 比值均较非梗死区增加($P < 0.05$)。结论 猪心肌缺血再灌注损伤后心肌梗死区、梗死边缘区、非梗死区均存在心肌细胞凋亡现象,细胞凋亡主要分布在梗死区和边缘区。

关键词:再灌注损伤;细胞凋亡;猪

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.11.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)11-1100-03

The experimental research of ischemia-reperfusion injury and myocardial apoptosis in swine*

Sun Haimei¹, Guo Tao², Wang Yuping¹, Tang Ruizhu³, Luo Zhilin², Shen Lijuan⁴

(1. Department of ICU;2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming, Yunnan 650031, China;3. Department of Clinic Laboratory Centre, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming, Yunnan 650032, China;4. Department of Pathology, Kunming Medical College, Kunming, Yunnan 650031, China)

Abstract: Objective To investigate the distribution of apoptosis on different area in pigs with myocardial infarction. **Methods** Ten Diannan small-ear pigs were divided into two groups ($n=5$) randomly: Sham-operated (S) group and ischemia-reperfusion (I/R) group. In S group, balloon catheter was positioned in the mid-distal left anterior descending (LAD) via right femoral artery under fluoroscopic guidance, without ischemia. In I/R group, the balloon was inflated and occluded the LAD for 60 minutes. At 72h after reperfusion, infarction size were measured by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. The apoptotic cells in the myocardium were determined with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-fluorescence in nick end (TUNEL) method, and protein expression of Bcl-2 and Bax were detected by immunohistochemical analysis. **Results** At 72h after reperfusion, there was no myocardial infarction and apoptosis in S group. In I/R group, apoptotic index (AI) of infarcted zone and border zone were significantly higher than those in non-infarcted zone, as well as Bax protein expressions and Bax/Bcl-2 ratio increased greatly compared with that in non-infarcted zone ($P < 0.05$). **Conclusion** There were apoptotic cells in infarcted zone, border zone and non-infarcted zone after I/R injury. Most of these apoptotic cells were in infarcted zone and border zone.

Key words: reperfusion injury; apoptosis; swine

研究显示,细胞坏死及凋亡均参与心肌缺血再灌注损伤,细胞凋亡可能是心肌缺血再灌注损伤发病机制中的重要环节^[1-3]。目前缺血再灌注损伤后心肌组织是否存在细胞凋亡,且凋亡在心肌梗死区、梗死边缘区、非梗死区的各个区域的分布情况文献报道并不一致^[1,4-5]。本研究属系列课题,采用体型较大且和人类冠脉最为相似的猪作为实验动物,在建立猪闭胸式心肌梗死模型的基础上,观察缺血再灌注损伤后心肌不同区域细胞凋亡的发生,探讨心肌再灌注损伤的相关机制。

1 材料与与方法

1.1 试剂与仪器 免疫组织化学主要试剂:Bcl-2 单克隆抗体、Bax 单克隆抗体、浓缩型组织抗原修复液、液体 DAB 酶底物显色试剂盒、PBS 粉剂、多聚-L-赖氨酸均购自福州迈新生物技术有限公司。末端标记法(TUNEL 法)试剂盒及 NBT 显色剂、蛋白酶 K、胃蛋白酶等均购自福州迈新生物技术有限公司。HPIAS-1000 高清晰病理图文分析系统(同济医科大学千屏影

像工程公司产品),戊巴比妥钠购自杭州赛诺菲公司。青霉素购自山东鲁抗药业。实验中导丝(长、短导丝及球囊导丝)、动脉鞘、穿刺针、导管及压力泵等为德国贝朗公司产品,为临床使用过的废旧材料,并在术前 12 h 用 2% 戊二醛消毒液浸泡消毒。数字减影血管造影机(飞利浦公司,FD10 机型)。心电图监护仪(美国公司,Dash3000 机型)。

1.2 实验动物及分组 10 只 8~11 个月健康滇南小耳猪,雌雄不据,体质量 19~24.5 kg,由昆明医学院动物实验室提供。实验动物随机分为两组:假手术组(S组, $n=5$),缺血再灌注组(I/R组, $n=5$)。

1.3 实验方法 猪闭胸式心肌缺血再灌注模型的制备,实验猪,空腹 6 h 以上,3% 戊巴比妥钠 20~30 mg/kg 耳缘静脉麻醉后将猪仰卧固定在手术台上施行手术。监测心电图及血压,据肢体运动情况每 20~30 min 重复静脉注射戊巴比妥钠 2~5 mg/kg,使猪保持麻醉状态。行右股动脉穿刺,置入 6F 动脉

* 基金项目:云南省应用基础研究项目基金资助(2007C243M)。

鞘,静脉注入肝素 8 000 U,后每隔 1 h 追加注射肝素 2 000 U。经动脉鞘置入 5F 猪尾导管至左心室,行左心室造影。以 5F 3.0 L 左冠状动脉造影导管分别行左、右冠状动脉造影,观察猪冠状动脉的分布情况。在导丝指引下,置入 2.0 mm 或 2.5 mm 的球囊至左前降支(LAD)第一对角支的远端,以 3~4 atm 打开球囊堵住 LAD。心肌梗死模型成功标志:冠脉造影示球囊远端血流中断,心电图表现为 V1~V3 导联出现 ST 段抬高,T 波高耸融合。撤除球囊形成再灌注,拔除动脉鞘管并压迫止血。S 组不行球囊充气堵住冠脉;I/R 组行球囊充气堵住 LAD 60 min 后直接撤除球囊。实验结束后肌注青霉素 400 万单位,在猪清醒之前送回动物中心。手术后约 1 h 猪苏醒,第 2 天即可进食。

1.4 心肌标本采集 心肌缺血再灌注 72 h 后,将实验猪用 3% 戊巴比妥钠静脉麻醉后,仰卧固定在手术台,开胸取心脏,生理盐水冲洗心脏后,据文献[6]报道分别快速、准确横切取每组 5 只实验猪的心肌梗死区、边缘区和非梗死区组织,4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋组织切片,行末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUPT 缺口 TUNEL 法和免疫组织化学法检测。

1.5 TUNEL 法检测心肌凋亡细胞 应用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUPT 缺口 TUNEL 法,严格按照试剂盒说明书进行操作。TUNEL 法检测细胞凋亡的阳性信号为棕色颗粒,定位于细胞核,阳性细胞在组织中的分布不一,染为蓝色的细胞核未发生凋亡。在梗死区、边缘区和非梗死区分别随机选取 5 张切片,应用 HPIAS-1000 高清晰病理图文分析系统在 10×40 倍镜下随机取 5 个视野,计数每个视野中的阳性细胞数以及总细胞数,据文献[7]报道对心肌细胞凋亡指数 (Apoptotic index, AI) 进行定量分析,以此反应凋亡程度。AI = 阳性细胞数/总细胞数×100%,以 5 个视野的均值代表每个区域的细胞凋亡指数。

1.6 免疫组织化学法检测 Bax 和 Bcl-2 的蛋白表达 采用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接法 (S-P 法)。用 PBS 代替一抗作阴性对照,每例均以 HE 染色切片作对照观察,严格按照说明书操作。

在光学显微镜下 Bax 和 Bcl-2 主要呈胞浆分布,其阳性细胞呈棕黄或棕褐色。本研究据文献报道采用阳性单位 (Positive unit, PU) 用于定量表达猪心肌组织 Bcl-2 和 Bax 的蛋白免疫组织化学阳性反应的程度。PU 值的大小与阳性反应程度成正比。在梗死区、边缘区和非梗死区分别随机选取 5 张切片,应用 HPIAS-1000 高清晰病理图文分析系统测定 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的 PU 值。以 5 个视野 PU 的均值代表每个区域 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达。

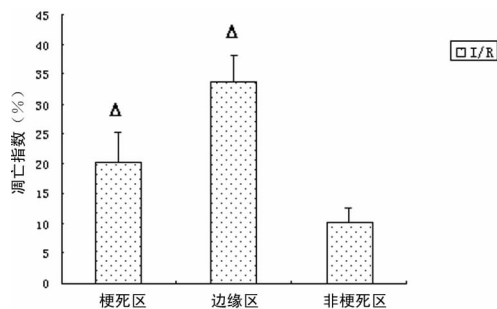
1.7 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间不同时间点均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TUNEL 法检测猪心肌细胞凋亡 TUNEL 检测细胞凋亡的阳性信号为棕色颗粒,定位于细胞核。S 组未发现凋亡阳性细胞(封 3 图 1),I/R 组的心肌梗死区、边缘区、非梗死区均发现凋亡阳性细胞,心肌细胞 AI 分别为 (20.45±4.7)%、(33.83±4.44)%、(10.29±2.25)%,梗死区和边缘区的 AI 较非梗死区明显增高 ($P < 0.05$)。提示凋亡细胞主要出现在心肌梗死区和边缘区(封 3 图 2~4,图 5)。

2.2 免疫组织化学法检测心肌组织 Bax 与 Bcl-2 的蛋白表达 免疫组织化学法结果显示,Bax 和 Bcl-2 蛋白表达主要定位

于胞浆,呈棕黄或棕褐色细颗粒状。S 组猪心肌细胞 Bcl-2 及 Bax 蛋白有一定量的表达,I/R 组心肌梗死区、边缘区和非梗死区的 Bax 蛋白表达及 Bax/Bcl-2 均较 S 组明显增高 ($P < 0.05$)。I/R 组心肌梗死边缘区和非梗死区 Bcl-2 蛋白表达较 S 组明显增高 ($P < 0.05$)。I/R 组心肌梗死区和边缘区的 Bax 及 Bax/Bcl-2 较非梗死区明显增高 ($P < 0.05$),见表 1~3。



△: $P < 0.05$, 与非梗死区相比。

图 5 TUNEL 法检测猪心肌细胞 AI (%) ($n=5, \bar{x} \pm s$)

表 1 猪心肌 Bcl-2 蛋白表达 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	梗死区	边缘区	非梗死区
S 组	14.35±4.27	14.35±4.27	14.35±4.27
I/R 组	19.53±4.26	19.32±5.42 [#]	24.19±4.93 [#]

[#]: $P < 0.05$, 与 S 组比较。

表 2 猪心肌 Bax 的蛋白表达 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	梗死区	边缘区	非梗死区
S 组	5.66±1.74	5.66±1.74	5.66±1.74
I/R 组	19.51±5.34 ^{#*}	21.20±5.20 ^{#*}	16.29±4.52 [#]

[#]: $P < 0.05$, 与 S 组比较; * : $P < 0.05$, 与非梗死区比较。

表 3 猪心肌 Bax/Bcl-2 变化 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	梗死区	边缘区	非梗死区
S 组	0.40±0.07	0.40±0.07	0.40±0.07
I/R 组	0.99±0.07 ^{#*}	1.10±0.07 ^{#*}	0.67±0.08 [#]

[#]: $P < 0.05$, 与 S 组比较; * : $P < 0.05$, 与非梗死区比较。

3 讨 论

探讨心肌缺血再灌注损伤的机制及心肌保护作用的方法是目前研究的热点^[8-13]。目前研究显示随着再灌注时间的延长,细胞凋亡逐渐增加,心肌梗死面积进一步扩大,心功能受损加重,细胞凋亡在再灌注损伤中发挥重要作用^[1-3]。

细胞凋亡是 1972 年由病理学家 Kerr 等首先提出的,并用含义为秋天树叶或花卉自然凋落的希腊词“apoptosis”来表述。细胞凋亡又称程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD),是一种不同于细胞坏死的生理性细胞死亡,是在多种基因以及细胞内外因子的严格控制下,经过多种途径的信号传递,导致细胞产生一系列形态和生物化学方面的改变而引起的细胞死亡。心肌细胞凋亡现象存在于心血管系统的许多生理和病理变化过程中,是多种心血管疾病的发生与演变的细胞学基础。以前认为正常成年心肌细胞分化良好,心肌细胞是不发生凋亡的,但近来的研究资料表明,当心肌压力负荷过度、心肌肥大和心力衰竭时,心肌细胞均可发生凋亡。Gottlieb 等首先在兔的心肌缺血再灌注模型上发现心肌细胞凋亡的现象,随后在不同的动物种属及人类的心脏上均发现缺血再灌注损伤导致心肌细胞凋亡^[14-15]。

本课题应用介入方法行球囊封堵冠脉建立猪闭胸式心梗

模型。传统的心肌梗死模型通过开胸结扎冠状动脉完成,该方法破坏胸腔的正常解剖结构,对心肺功能影响大;同时手术造成损伤和炎症对动物的创伤大,不利于术后恢复。而利用介入方法行球囊封堵冠状动脉建立猪闭胸式心肌梗死模型,对动物机体的生理状态干扰降到最小,并可最大程度地模拟临床心肌梗死发生。因该方法有影像学的支持,使球囊封堵冠状动脉的位置相对固定,从而使心肌梗死的面积相对稳定;同时实验中可通过控制球囊的放气-充气,实现对心肌缺血和再灌注时间的准确控制^[16]。

研究结果显示,再灌注 72 h,采用 TUNEL 法检测心肌梗死后各区的凋亡细胞,假手术组未发生心肌细胞凋亡,而缺血再灌注组心肌梗死区、边缘区及非梗死区均有细胞凋亡发生,提示细胞凋亡参与心肌缺血再灌注损伤。通过 TUNEL 阳性细胞 AI 的检测,细胞凋亡主要出现在坏死中心区域和低灌注梗死边缘区,这与其他文献报道的研究结果一致^[11,14,17]。

细胞凋亡是一种细胞主动的死亡过程,在整个过程中牵涉到一系列相关基因的表达,其中 Bcl-2 基因家族是目前较为公认与凋亡密切相关的基因,研究表明,Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中具有代表性的抗凋亡和促凋亡蛋白^[18]。本研究采用免疫组织化学法检测猪不同心肌梗死区域中 Bcl-2 家族中 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达。实验中采用高清晰度彩色病理图文分析系统,用阳性单位定量表达免疫组织化学阳性反应的程度。结果表明,缺血再灌注损伤可使心肌梗死区、边缘区及非梗死区中凋亡相关基因 Bax 的蛋白表达及 Bax/Bcl-2 增加,与相应区域心肌细胞凋亡增多的结果一致,但缺血再灌注梗死边缘区及非梗死区的 Bcl-2 蛋白表达也增加值得进一步研究。同时,缺血再灌注组心肌梗死区及边缘区的 Bax 蛋白表达及 Bax/Bcl-2 比值较非梗死区增加,与细胞凋亡主要分布在心梗死区及边缘区的结果一致。

本文对猪不同心肌梗死区域细胞凋亡的分布和凋亡密切相关 Bcl-2、Bax 蛋白表达的变化进行了探讨和分析,结果表明细胞凋亡参与心肌缺血再灌注损伤,细胞凋亡主要出现在坏死中心区域和低灌注梗死边缘区,对心肌再灌注损伤的发生机制进行了有益的探索,抑制心肌细胞凋亡可能是心肌保护作用的有效途径。

参考文献:

- [1] Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, et al. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion[J]. *Apoptosis*, 2001, 6(4): 279-290.
- [2] Rodriguez M, Lucchesi BR, Schaper J. Apoptosis in myocardial infarction[J]. *Ann Med*, 2002, 34(6): 470-479.
- [3] Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Baldi A. Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling[J]. *J Cell Physiol*, 2002, 193(2): 145-153.
- [4] Veinot JP, Gattinetti DA, Fliss A, et al. Early apoptosis

in human myocardial infarcts[J]. *Hum Pathol*, 1997, 28(4): 485-492.

- [5] Dispersyn GD, Borgers M. Apoptosis in the heart: about programmed cell death and survival[J]. *News Physiol Sci*, 2001, 16: 41-47.
- [6] Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, et al. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280(6): H2726-H2731.
- [7] Zhang HF, Fan Q, Qian XX, et al. Role of insulin in the anti-apoptotic effect of glucose-insulin-potassium rabbits with acute myocardia ischemia and reperfusion[J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6): 777-783.
- [8] Sun HM, Guo T, Liu T, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after acute myocardial infarction in pigs[J]. *Heart Surgery Forum*, 2010, 13(5): E305-E310.
- [9] 孙海梅, 郭涛. 缺血后处理心肌保护作用的基础与临床研究[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(6): 1111-1113.
- [10] Verma S, Fedak PW, Weisel RD, et al. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist[J]. *Circulation*, 2002, 105(20): 2332-2336.
- [11] Girm HR, Ahilathirunayagam S, Mavor AI, et al. Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies[J]. *Vasc Endovascular Surg*, 2007, 41(4): 277-293.
- [12] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 缺血后处理对缩小猪急性心肌梗死面积的作用观察[J]. *重庆医学*, 2010, 39(5): 522-523.
- [13] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 缺血后处理对猪心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(3): 384-386.
- [14] Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, et al. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death[J]. *Cardio vasc Res*, 2000, 45(3): 651-660.
- [15] Freude B, Masters TN, Robicsek F, et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32(2): 197-208.
- [16] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 以球囊封堵法建立猪心肌梗死模型的可行性研究[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(46): 9032-9036.
- [17] Blagosklonny MV. Spotlight on apoptosis. Introduction [J]. *Leukemia*, 2000, 14(8): 1500-1501.
- [18] Kubasiak LA, Hernandez OM, Bishopric NH, et al. Hypoxia and acidosis activate cardiomyocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(29): 12825-12830.

(收稿日期: 2011-11-08 修回日期: 2011-12-09)

(上接第 1093 页)

al. Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the interorganizational task force on nucleic acid amplification testing of blood donors[J]. *Transfusion (Paris)*, 2000, 40(2): 143-159.

- [14] Shan H, Wang JX, Ren FR, et al. Blood banking in China

[J]. *Lancet*, 2002, 360(9347): 1770-1775.

- [15] Chamberland ME, Alter HJ, Busch MP, et al. Emerging infectious disease issues in blood safety[J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(3 Suppl): 552-553.

(收稿日期: 2011-11-27 修回日期: 2011-12-25)