

· 基础研究 ·

脂联素及其受体在 LIPC 抗 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡中的作用*

高建芝¹, 赵林静², 张婧君³, 滕清蕾^{3△}

(1. 新乡医学院基础医学院法医综合实验室, 河南新乡 453003; 2. 新乡医学院基础医学院微生物学教研室, 河南新乡 453003; 3. 新乡医学院第三附属医院麻醉科, 河南新乡 453003)

摘要:目的 研究脂联素(ADP)及其受体在缺血预适应(LIPC)抗缺血、再灌注(MIRI)大鼠心肌细胞凋亡中的作用。方法 雄性 SD 大鼠分为 3 组(n=10, 每组 4 只备用用于细胞凋亡); 假手术(sham 组): 左冠状动脉前降支仅穿线不处理; MIRI 组: 左前降支缺血 30 min, 再灌注 120 min; LIPC 组: 肢体缺血 5 min, 再灌注 5 min, 连续预适应 3 d 后实施缺血 30 min, 再灌注 120 min。采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法和原位末端缺口标记(TUNEL)法检测各组心肌组织 ADP 和 ADP 受体 1(ADPR1)的 mRNA 表达和心肌细胞的凋亡指数。结果 与 sham 组相比, MIRI 组 ADP 和 ADPR1 的 mRNA 表达明显减少($P < 0.05$); 与 MIRI 组相比, LIPC 组 ADP 和 ADPR1 的 mRNA 表达上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$); MIRI 组大鼠心肌细胞的凋亡指数(AI)比 sham 组增加显著, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 MIRI 组相比, LIPC 组心肌细胞的 AI 明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 LIPC 可能通过 ADP 信号通路减轻心肌-再灌注损伤后的细胞凋亡, 发挥其心肌保护作用。

关键词: 缺血预处理; 心肌再灌注损伤; 脂联素; 脂联素受体 1; 信号转导; 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.36.025

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)36-4427-03

The role of adiponectin and adiponectin receptor-1 in limb ischemic preconditioning against apoptosis after myocardial ischemia-reperfusion injury*

Gao Jianzhi¹, Zhao Linjing², Zhang Jingjun³, Teng Qinglei^{3△}

(1. Forensic Laboratory, Basic Medical College of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China;

2. Department of Microbiology, Basic Medical College of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China;

3. Department of Anesthesiology, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Objective To evaluate the role of adiponectin (ADP) and adiponectin receptor-1 (ADPR1) in limb ischemic preconditioning (LIPC) against apoptosis after myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI). **Methods** SD rats were divided into 3 groups (n=10, 4 rats of every group were prepared for detecting apoptosis). Group sham (group in sham operated) were processed identically except the left coronary artery was not be ligated; group MIRI (group in ischemia reperfusion) were subjected to occlusion of the left coronary artery anterior descending (LAD) followed by reperfusion, occlusion for 30 min and reperfusion for 120 min; group LIPC (group in limb ischemic preconditioning) were subjected to ischemia and reperfusion on the left hind limb for 5 min in turn for 3 d. LAD were performed ischemia for 30 min and reperfusion for 120 min at the 4th day. The expression of the level of myocardial ADP and ADPR1 mRNA of group sham, group MIRI and group LIPC were determined by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The apoptosis index of every group were determined by method of terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) respectively. **Results** Compared with group sham, the expression of ADP and ADPR1 mRNA in group MIRI lessened apparently ($P < 0.05$); compared with group MIRI, the expression of ADP and ADPR1 mRNA in group LIPC increased statistically significant ($P < 0.05$); compared with group sham, the apoptosis index (AI) of myocardial cells in group MIRI increased apparently ($P < 0.05$); compared with group MIRI, the AI of myocardial cells in group LIPC decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Limb ischemic preconditioning; decreased apoptosis after myocardial ischemia-reperfusion injury via activating ADP signaling pathways, which played a protective role in myocardial tissue.

Key words: ischemic preconditioning reperfusion injury; myocardium; adiponectin; receptor1, adiponectin; apoptosis

近年国内外学者研究发现, 心肌缺血-再灌注(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)引起的心肌损伤与心肌细胞的信号转导通路密切相关。目前临床上许多药物及机械处理大都是通过细胞信号转导通路来实现对心肌的保护作用。其中脂联素/脂联素受体 1(adiponectin/adiponectin receptor-1, ADP/ADPR1)信号转导通路是近期的研究热点, 在促进细胞的生存中发挥着极其重要的作用^[1-4]。近年来, 通过对

ADP 的研究证实了其在心血管领域的生物学效应, 包括调节促增殖反应、抗凋亡作用和抗感染作用等^[5-9]。尽管 ADP 在 MIRI 中有抗损伤和抗凋亡的作用, 但其是否通过 ADP/ADPR1 信号通路对损伤的心肌细胞起保护作用及其机制仍不清楚。本研究旨在探讨在体内状态下, ADP/ADPR1 信号通路是否在抗 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡中发挥作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本研究采用 SD 雄性大鼠 30 只, 体质量 220~280 g, 由河南省实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 DNA 标记、总 RNA 提取试剂盒和逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 原位末端缺口标记细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及处理 实验分为 3 组, 每组 10 只。MIRI 组: 结扎冠状动脉左前降支 30 min 再灌注 120 min; 假手术 sham 组: 手术过程与 MIRI 组相似, 仅穿线不结扎冠状动脉左前降支; 肢体缺血预适应 (limb ischemic preconditioning, LIPC) 组: 持续阻断股动脉标志 5 min 后, 持续再灌注 5 min, 如此反复 3 次, 连续预适应 3 d, 第 4 d 进行 MIRI 实验, 手术操作同 MIRI 模型。各组实验结束时, 迅速摘取每组大鼠心脏缺血区中心部分的心肌组织作为留存的心肌组织标本并放置在无菌无热源冻存管内后置入液氮罐中, 随后放入 -80°C 冰箱中。

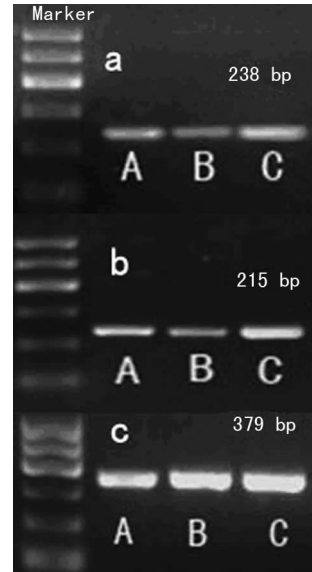
1.2.2 RT-PCR 检测 采用 Trizol 一步法提取各组大鼠心肌总 RNA 进行逆转录。β-actin: 上游引物: 5'-CAG TAA CAG TCC GCC TAG AA-3', 下游引物: 5'-GAT TAC TGC TCT GGC TCC TA-3' 379 bp; ADP: 上游引物: 5'-CTT CCA GAA ACG TGA TCC GAA-3' 238 bp, 下游引物 5'-AGT CCT TGC AGG AAG AGT GAC C-3'; ADPR1: 上游引物 5'-GGT GAA GGT CGG AGT CAA CGG-3' 215 bp, 下游引物 5'-GGT CAT GAG TCC TTC CAC GAT-3'。PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳观察, 成像。

1.2.3 原位末端缺口标记 (TUNEL) 法检测心肌细胞凋亡 具体操作步骤完全按照试剂盒说明书进行, 以磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替反应液做阴性对照。凋亡的细胞核呈棕黑色或棕色。每只大鼠观察 4 张切片, 每张切片计数 5 个视野 ($\times 400$), 计算每个视野内凋亡阳性细胞核数占细胞总数百分比, 取其平均值为心肌细胞凋亡指数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件处理数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

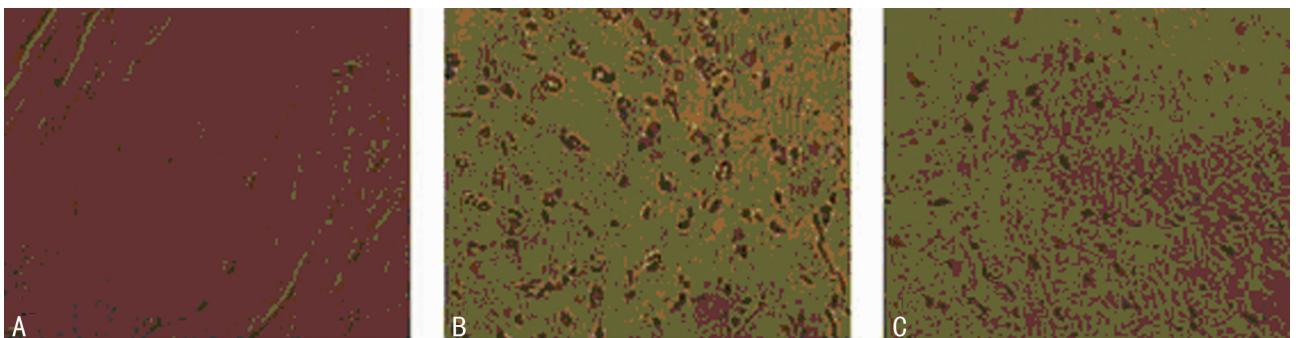
2.1 各组 ADP 和 ADPR1 mRNA 检测结果 RT-PCR 法测 ADP 和 ADPR1 的 mRNA 表达结果显示, 以 β-actin 为内参, 用 ADP 和 ADPR1 与 β-actin 比值代表目的条带强度的相对值, 与 sham 组 ADP (0.74 ± 0.08) 和 ADPR1 (0.72 ± 0.041) 相比, MIRI 组 ADP (0.53 ± 0.07) 和 ADPR1 (0.52 ± 0.016) 的 mRNA 表达明显减少 ($P < 0.05$); 与 MIRI 组相比, LIPC 组上调 ADP (0.72 ± 0.21) 和 ADPR1 (0.80 ± 0.023) 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 见图 1。



a: 各组大鼠心肌组织 ADP mRNA 的表达情况; b: 各组大鼠心肌组织 ADPR1 mRNA 的表达情况; c: 各组大鼠心肌组织 β-actin mRNA 的表达情况。A: sham 组; B: MIRI 组; C: LIPC 组。

图 1 各组大鼠心肌组织 ADP、ADPR1 mRNA 的表达情况

2.2 TUNEL 法检测各组心肌细胞凋亡的情况 棕色核为凋亡细胞核, 计算凋亡指数 (AI), 结果显示 sham 组大鼠凋亡心肌细胞较少见; MIRI 组大鼠凋亡阳性细胞数目 (18.68 ± 2.81) 比 sham 组 (2.01 ± 0.44) 明显增加 ($P < 0.05$); 与 MIRI 组相比, LIPC 组的心肌细胞 AI (8.17 ± 1.93) 明显减少 ($P < 0.05$), 提示 LIPC 可以减轻 MIRI 损伤诱导的心肌细胞凋亡, 见图 2。



A: sham 组; B: MIRI 组; C: LIPC 组。

图 2 各组大鼠心肌细胞凋亡情况的比较 ($\times 400$)

3 讨论

研究表明 ADP/ADPR1 信号通路参与了抑制炎症反应和抑制细胞凋亡的过程^[10-11]。近年又发现 MIRI 损伤后, ADP 也参与了损伤心肌的修复, 增加 ADP 水平或增加心肌对 ADP

的敏感性可减轻心肌梗死后左心室的功能障碍^[12]。

血清 ADP 通过血液循环到达心肌组织与 ADPR1 结合发挥心肌保护作用。至今共发现 3 种 ADP 受体: ADPR1、ADPR2 和 T 钙粘蛋白, 其分布呈高度组织特异性^[13], 其中 AD-

PR1 主要分布在心肌。心肌局部 ADP 与心肌细胞能量代谢及功能状态密切相关^[14]。也有研究表明,血清 ADP 与 AD-PR1 结合可发挥心肌保护作用,如可以减轻 MIRI 损伤、心肌重塑和左心室收缩功能障碍^[15]。

近年来通过离体结扎冠状动脉前降支造成 MIRI 模型发现,与野生鼠比较,ADP 基因敲除鼠的心脏明显扩大,心肌细胞凋亡数量和心肌纤维化程度明显增加,而新生毛细血管密度显著降低^[16]。

肢体 LIPC 可以合成释放内源性保护物质,然后经复杂的细胞信号转导途径发挥 MIRI 保护作用。心肌细胞 ADP/AD-PR1 途径的激活就是此保护作用的具体机制之一,可以引起下游一系列靶蛋白的磷酸化,抑制线粒体通透性转换孔(mPTP)的开放,最终减少心肌细胞凋亡^[17]。

本实验结果显示,MIRI 大鼠心肌 ADPR1 表达水平下降,限制了 ADP 发挥其生物学作用,尤其是对 MIRI 大鼠心肌细胞凋亡的过程起促进作用。MIRI 大鼠 ADP 和 ADPR1 mRNA 的表达明显低于 sham 组, LIPC 组较 MIRI 组心肌组织 ADP 和 ADPR1 mRNA 的表达明显增高,以上各组心肌组织 ADP mRNA 的表达水平与 ADPR1 mRNA 表达水平呈正相关,提示 ADP 与其受体的结合对心肌组织的保护作用以及 LIPC 的心脏保护效应是通过上调 ADP 的水平实现的。

在本实验中 LIPC 明显抑制了再灌注损伤后的细胞凋亡,且 LIPC 组中 ADP 和 ADPR1 mRNA 的表达高于 MIRI 组,提示 LIPC 具有抑制细胞凋亡的作用并且可能通过 ADP/AD-PR1 信号通路来抑制心肌细胞凋亡。

参考文献:

- [1] Baker JL, Olsen LW, Thorkild TI. Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(23): 2329-2337.
- [2] Denzel MS, Scimia MC, Zumstein PM, et al. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(12): 4342-4352.
- [3] Wijesekara N, Krishnamurthy M, Bhattacharjee A, et al. Adiponectin-induced ERK and Akt phosphorylation protects against pancreatic beta cell apoptosis and increases insulin gene expression and secretion [J]. *Biol Chem*, 2010, 285(44): 33623-33631.
- [4] Shibata R, Sato K, Pimentel DR, et al. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2- dependent mechanisms [J]. *Nat Med*, 2005, 11(10): 1096-1103.
- [5] Pyrzak B, Ruminska M, Popko K, et al. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome in children and adolescents [J]. *Eur J Med Res*, 2010, 15(2): 147-151.
- [6] Tao L, Wang Y, Gao E, et al. Adiponectin; an indispensa-

- ble molecule in rosiglitazone cardioprotection following myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2010, 106(2): 409-417.
- [7] Wang Y, Tao L, Yuan Y, et al. Cardioprotective effect of adiponectin is partially mediated by its AMPK-independent antinitrative action [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297(2): 384-391.
- [8] Solomon SD, McMurray JJ, Pfeffer MA, et al. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma Prevention [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(11): 1071-1080.
- [9] Wu L, Qiao H, Li Y, et al. Protective roles of puerarin and Danshensu on acute ischemic myocardial injury in rats [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(10): 652-658.
- [10] Shibata R, Izumiya Y, Sato K, et al. Adiponectin protects against the development of systolic dysfunction following myocardial infarction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(6): 1065-1074.
- [11] Duda MK, O'Shea KM, Lei B, et al. Dietary supplementation with omega-3 PUFA increases adiponectin and attenuates ventricular remodeling and dysfunction with pressure overload [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 76(20): 303-310.
- [12] Kondo K, Shibata R, Unno K, et al. Impact of a single intracoronary administration of adiponectin on myocardial ischemia/reperfusion injury in a pig model [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2010, 3(2): 166-173.
- [13] Ohmori R, Momiyama Y, Kato R, et al. Associations between serum resistin levels and insulin resistance, inflammation, and coronary artery disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(2): 379-380.
- [14] 汪俊, 邵名亮, 曹衡, 等. 脂联素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中华心血管病杂志*, 2010, 38(3): 252-258.
- [15] Smith CC, Yellon DM. Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection [J]. *PHarmacol Ther*, 2011, 129(2): 206-219.
- [16] Gonon AT, Widegren U, Bulhak A, et al. Adiponectin protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury via AMP-activated protein kinase, Akt and nitric oxide [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(1): 116-122.
- [17] Argaud L, Gateau-Roesch O, RaiSky O, et al. Postconditioning inhibits mitochondrial Permeability transition [J]. *Circulation*, 2005, 111(2): 194-197.

(收稿日期: 2013-09-08 修回日期: 2013-10-12)

欢迎投稿

欢迎订阅