

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)22-2039-03

## 肾缺血预处理对兔未成熟心肌 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白表达的影响

孙忠东<sup>1</sup>, 高尚志<sup>2</sup>, 池一凡<sup>1</sup>, 夏家红<sup>3</sup>, 杨辰垣<sup>3</sup> ( <sup>1</sup> 青岛大学医学院附属青岛市立医院心血管外科, 山东 青岛 266011, <sup>2</sup> 武汉大学人民医院胸心血管外科, 湖北 武汉 430060, <sup>3</sup> 华中科技大学同济医学院协和医院心血管外科, 湖北 武汉 430022 )

## Effects of renal ischemic preconditioning on the expressions of Bcl-2, Bax, Fas proteins in immature myocardial cells in rabbits

SUN Zhong-Dong<sup>1</sup>, GAO Shang-Zhi<sup>2</sup>, CHI Yi-Fan<sup>1</sup>, XIA Jia-Hong<sup>3</sup>, YANG Chen-Yuan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiovascular Surgery, Qingdao Municipal Hospital, Medical College, Qingdao University, Qingdao 266011, China, <sup>2</sup>Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China, <sup>3</sup>Department of Cardiovascular Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

**【Abstract】** AIM: To investigate the effects of renal ischemic preconditioning (RIP) on apoptosis and expressions of Bcl-2, Bax and Fas proteins in immature myocardial cells in rabbits. METHODS: Isolated working rabbit heart model was used in this study and 24 immature rabbits were randomly divided into control group, ischemia/reperfusion (I/R) group and RIP group. The TUNEL, nucleosomal ladder of DNA fragments and the expression of Bcl-2, Bax and Fas proteins were detected. RESULTS: Compared with that in I/R group, TUNEL cell apoptosis was lower [ (4.19 ± 1.13)% vs (12.30 ± 2.10)% , P < 0.01 ], ladder of DNA fragments was lower (57 350 ± 1765 vs 135 200 ± 3370, P < 0.01), Bcl-2 expression was higher (33 525 ± 1026 vs 12 385 ± 860, P < 0.01), Bax expression was lower (8640 ± 768 vs 32 472 ± 1128, P < 0.01) and Fas expression was lower (8936 ± 912 vs 32 100 ± 1260, P < 0.01) in RIP group. CONCLUSION: RIP decreases immature myocardial cell apoptosis and affects the expressions of Bcl-2, Bax and Fas proteins.

**【Keywords】** kidney; ischemic preconditioning; apoptosis; Bcl-2; Bax; Fas

**【摘要】** 目的: 探讨肾缺血预处理(RIP)对兔未成熟心肌细

收稿日期 2004-10-27; 修回日期 2005-01-12

作者简介 孙忠东(1970-)男(汉族), 山东省淄博市人, 博士, 主治医师。Tel. (0532) 82789459 Email. szd118@163.com

胞凋亡和 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白表达的影响。方法: 24 只幼兔采用 Langendorff 离体心脏灌注模型, 随机分为正常对照组(C)、心脏缺血/再灌注组(I/R)和肾缺血预处理组(RIP), 每组 8 只, 测定各组未成熟心肌细胞凋亡和 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白表达。结果: RIP 组与 I/R 组比较, 心肌细胞凋亡率明显减少(4.19 ± 1.13)% vs (12.30 ± 2.10)% , P < 0.01 ] , DNA 片段梯光密度明显减少(57 350 ± 1765 vs 135 200 ± 3370, P < 0.01), Bcl-2 表达增多(33 525 ± 1026 vs 12 385 ± 860, P < 0.01), Bax(8640 ± 768 vs 32 472 ± 1128, P < 0.01)和 Fas(8936 ± 912 vs 32 100 ± 1260, P < 0.01)表达明显减少。结论: RIP 可减少缺血再灌注后兔未成熟心肌细胞凋亡和影响 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白的表达。

**【关键词】** 肾 缺血预处理 细胞凋亡 Bcl-2 Bax Fas

**【中图分类号】** R654.1 **【文献标识码】** A

## 0 引言

实验表明, 成熟心肌和心肌外的组织器官缺血预处理可减少心肌细胞凋亡的发生, 其中 Bcl-2, Bax, Fas 等基因蛋白的表达在细胞凋亡中起重要作用。肾缺血预处理(renal ischemic preconditioning, RIP)对未成熟心肌细胞凋亡是否有影响的报道甚少。本实验目的是观察 RIP 对兔未成熟心肌细胞凋亡和 Bcl-2, Bax, Fas 等基因蛋白表达的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 出生 14~21 d 的健康长耳大白兔 24 只(华中科技大学同济医学院动物室提供), 雌雄不拘。MPIAS-1000 型多媒体病理图像分析系统(华中科技大学同济医学院清平影像工程公司生产)进行光密度测定。细胞凋亡试剂盒购自南京建成生物技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 模型建立及分组** 按处理方式不同将动物随机分为 3 组, 每组 8 只。开胸, 右心耳注入肝素(300 U/kg), 切开主动脉插入灌注管, 即行 KH 液 Langendorff 灌流, 灌注压为 6 kPa(45.0 mmHg)。切取心脏, 结扎肺静脉, 剪开左心耳将内径 3 mm 左房灌注管插入左房, 内径 1 mm 测压管插入左心室。左房灌注压为 1 kPa(7.5 mmHg)左心后负荷为 3.0 kPa(22.5

mmHg). KH 缓冲液成分 (mmol/L): NaCl 118.50, KCl 4.70, CaCl<sub>2</sub> 2.50, MgSO<sub>4</sub> 1.20, NaHCO<sub>3</sub> 25.00, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.20, Glucose 11.10, Na<sub>2</sub>EDTA 0.50. 使用时新鲜配制, 经 0.45 μm 滤器过滤, 灌流前给予体积分数为 950 mL/L O<sub>2</sub> 和 50 mL/L CO<sub>2</sub> 混合气体按 1.5 L/min 向储液瓶内的灌流液中通气 30 min, 灌流液维持在 37℃, pH 为 7.4, 渗透压为 824 ~ 850 kPa/L [320 ~ 330 mosm/L, 1 mosm = 2.5787 kPa(37℃)].

① 正常对照组 (C): 仅灌注 KH 液 180 min, 然后取心肌标本. ② 缺血/再灌注组 (I/R): 灌注 20 min 后, 停灌 45 min, 复灌 120 min. ③ 肾缺血预处理组 (RIP): 反复 2 次阻断肾血流 5 min/放开 5 min, 建立 Langendorff 模型, 然后重复 I/R 组缺血/再灌注方法.

1.2.2 观察指标 ① 凋亡细胞原位标记与半定量分析: 左心室心肌组织常规石蜡包埋, 采用末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT 酶) 介导带荧光的 deuridine triphosphate (dUTP) 缺口末端标记法 (terminal transferase UTP nick end labeling, TUNEL)<sup>[11]</sup> 标记凋亡细胞核中 DNA 3'-OH 末端, 经脱蜡, 洗脱, 消化, 孵育, 洗脱, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 镜下观察. 根据凋亡阳性细胞分布情况, 每张切片拍摄 5 个阳性视野, 每视野计数 300 个心肌细胞中阳性细胞数, 以平均计算阳性细胞所占的百分比作为凋亡细胞阳性指数 (AI). ② 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段梯: 采用快速法检测 DNA 片段梯<sup>[21]</sup>. ③ Bcl-2, Bax, Fas 基因蛋白的表达: 采用 Western Blot 法. 用 2 × SDS 样品缓冲液裂解细胞, 收集细胞蛋白质, 经 SDS-PAGE 分离后迅速转移至尼龙膜, 按文献 [3] 法加入单抗 (1:1000) 及碱性磷酸酶偶联的抗小鼠 IgG (1:1000) 用 BCIP/NBT 显色. 应用 MPIAS-1000 型多媒体彩色病理图像分析系统进行定量测定 A 值.

统计学处理: 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义.

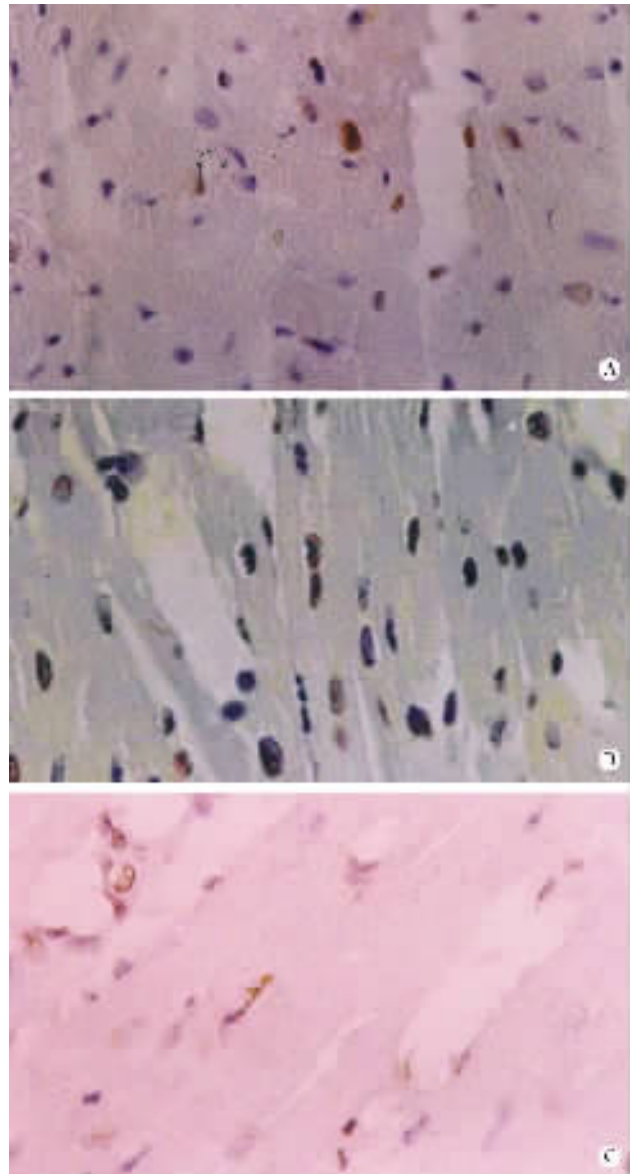
## 2 结果

2.1 凋亡细胞原位标记与半定量分析 RIP 组的细胞凋亡率为 (4.19 ± 1.13)%, 与 I/R 组的 (12.30 ± 2.10)% 比较 *P* < 0.01 (Fig 1).

2.2 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段梯 DNA 片段梯光密度测定 RIP 组 (57 350 ± 1765) 与 I/R 组 (135 200 ± 3370) 比较差异有统计学意义 (*P* < 0.01).

2.3 Bcl-2, Bax, Fas 蛋白的表达 密度测定 Bcl-2 蛋白 RIP 组 (33 525 ± 1026) 与 I/R 组 (12 385 ± 860) 比较差异有统计学意义 (*P* < 0.01); Bax 蛋白 RIP 组

(8640 ± 768) 与 I/R 组 (32 472 ± 1128) 比较差异有统计学意义 (*P* < 0.01); Fas 蛋白 RIP 组 (8936 ± 912) 与 I/R 组 (32 100 ± 1260) 比较差异有统计学意义 (*P* < 0.01).



A: Control group (DAB × 200); B: Ischemia/reperfusion group (DAB × 200); C: Renal ischemic preconditioning group (DAB × 200).

Fig 1 Immature myocardial cell apoptosis by TUNEL in rabbits

图 1 兔未成熟心肌细胞凋亡

## 3 讨论

缺血再灌注损伤可诱发细胞凋亡的发生<sup>[4]</sup>, 细胞凋亡已成为再灌注损伤发病机制中一个重要环节. 通过干预凋亡基因的表达阻断细胞凋亡以减轻再灌注损伤的研究是近年来细胞分子生物学研究的重点之一.

近年来研究认为心肌缺血预处理可减少细胞凋

亡的发生<sup>[5]</sup>。心肌缺血预处理是通过 PKC 的信号传递来保护心机的, PKC 和 mitoKATP 与凋亡信号转导途径相关连, 从而影响心机的细胞凋亡<sup>[6]</sup>, 而 RIP 的心肌保护作用亦与 PKC 和 mitoKATP 相关。Bcl-2 主要表达于线粒体外膜、核膜和内质网膜上, 其表达可抑制细胞凋亡, Bax 表达则促进细胞凋亡。细胞凋亡是一种受促凋亡基因如 *fas* 和抗凋亡基因如 *bcl-2* 调控的主动性细胞死亡过程。Fas 属于 TNF 受体家族, 由 Fas 介导的细胞凋亡存在于多种细胞系中。心肌细胞膜表达功能性的 Fas 和 FasL, 但是在正常情况下 Fas 和 FasL 并不介导心肌细胞发生凋亡。

我们通过建立 Langendorff 灌注模型检验了 RIP 对兔未成熟心肌细胞凋亡及 Bcl-2, Bax, Fas 基因蛋白表达的影响, 发现 RIP 使缺血再灌注后兔未成熟心肌细胞凋亡明显减少, Bcl-2 基因蛋白的表达明显增多, 而 Bax, Fas 基因蛋白的表达明显减少, 说明在兔未成熟心肌 RIP 可通过影响 Bcl-2, Bax, Fas 基因蛋白的表达而减少心肌细胞凋亡。

## 【参考文献】

- [1] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation [J]. *J Cell Biol*, 1992 119 493 - 501.
- [2] 姜泊. 分子生物学常用实验方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1996 177.
- [3] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989 1860 - 1874.
- [4] Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes [J]. *J Clin Invest*, 1994 94 1621 - 1628.
- [5] Wang NP, Bufkin BL, Nakamura M, et al. Ischemic preconditioning reduces neutrophil accumulation and myocardial apoptosis [J]. *Ann Thorac Surg*, 1999 67 1689 - 1695.
- [6] Akao M, Ohler A, O'Rourke B, et al. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells [J]. *Circ Res*, 2001 88 1267 - 1275.

编辑 甄志强

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2005)22-2041-01

## 角膜缘干细胞治疗严重角膜烧伤 6 例

刘杰, 周朝晖, 皮裕珺

(解放军 304 医院临床部眼科, 北京 100037)

【关键词】烧伤, 角膜缘干细胞

【中图分类号】R772 【文献标识码】B

1 临床资料 1997-01/2002-12 我院眼科采用角膜缘干细胞移植、角膜干细胞联合羊膜移植重建严重损伤的角膜表面 6 例, 均为男性, 年龄 10 ~ 46(平均 24)岁, 其中爆炸伤 3 例, 化学烧伤 2 例, 铁水烧伤 1 例。2 例角膜混浊、持续性角膜上皮缺损、角膜出现溶解迹象。4 例角膜白斑、角膜血管化、假性翼状胬肉、眼睑内或外翻、眼睑与球结膜粘连。2 例行带角膜缘干细胞的角膜板层移植、4 例行角膜缘干细胞联合羊膜移植手术。术后抗感染、营养支持及抗排斥反应药物。术后 1 wk 内, 结膜充血, 术区组织轻度水肿, 病变角膜上皮重建。未出现植片排斥现象。眼球粘连解除, 眼球运动自如。继而角膜上皮稳定, 角膜透明性增强, 角膜上皮重建, 新生血管消退。供区角膜缘区未形成假性胬肉或新生血管进入角膜等并发症。随访 5 ~ 24 mo, 上述 6 例患者治疗后视力均有所恢复, 眼球运动度增加, 角膜白斑被黑色角膜所取代。眼外观、视功能、眼球运动度均有改善。

2 讨论 研究表明在人和动物的活体及离体细胞培养研究中, 发现角膜上皮愈合是通过上皮细胞的移行和增殖来完成

的。在角膜缘基底部存在特殊的“Vogt 栅栏”结构, 与基底膜联系十分紧密, 其中含有色素、丰富的血管网, 角膜缘干细胞即存在于此<sup>[1]</sup>。干细胞不仅可以分化、增殖为上皮细胞, 更重要的是, 干细胞象一道屏障, 阻止结膜上皮细胞移行至角膜表面, 这对于保持角膜的透明性与正常生理功能有重要意义。上述 6 例患者均因各种烧伤、爆炸伤等因素导致角膜缘干细胞严重缺损, 出现角膜结膜化。我们认为, 角膜缘干细胞移植对严重眼表缺损的患者有益。是一种促进角膜损伤愈合、稳定角膜表面、修复角膜上皮糜烂和持续性上皮缺损、减少角膜新生血管侵入、阻止假性翼状胬肉形成、增进视力, 提高角膜移植成功率的有效方法。患者中有眼睑球结膜粘连者, 手术中将粘连分离后创面采用人羊膜移植覆盖。较成功的修复创面、分离粘连, 使眼球运动自如。人羊膜包括一层很厚的基底膜和无血管的基质, 羊膜基底膜易使上皮细胞移行长入, 增强基质上皮细胞的黏附性, 促进上皮的分化、增殖, 阻止上皮细胞凋亡, 并具有抗炎、抑制新生血管生长, 防止结膜下纤维组织增生, 阻止假性胬肉侵入等作用<sup>[2]</sup>。若有广泛角膜缘缺损者必须联合角膜缘干细胞移植术<sup>[1,3,4]</sup>。

## 【参考文献】

- [1] Shimazaki J, Shinozaki N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon [J]. *Br J Ophthalmol*, 1998 82(2): 235.
- [2] Reinhard T, Kruse FE. Limbal transplantation for reconstruction of the ocular surface [J]. *Ophthalmology*, 2001 98(9) 818.
- [3] 陈家祺, 周世有, 黄挺, 等. 新鲜羊膜移植重建严重瘢痕期和炎症期眼表的临床研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2000 36(1): 13 - 17.
- [4] Soong HK, Farjo AA, Katz D, et al. Lamellar corneal patch grafts in the management of corneal melting [J]. *Cornea*, 2003 19(2) 126.

编辑 许昌泰

收稿日期 2005-03-03; 修回日期 2005-03-23

作者简介 刘杰 (1965-), 女(汉族), 内蒙古自治区呼和浩特市人。硕士生(导师马志中)。Tel. (010) 66867090 Email. liujie01983@sina.com