

·基础研究·

解偶联蛋白-2在大鼠缺血预适应心肌中的表达

黄兆琦^{1,2} 江时森² 吕磊² 汪春晖²

摘要 目的: 探讨解偶联蛋白-2(UCP2)在心肌缺血预适应(IPC)心肌保护中的作用。**方法:** 采取结扎左冠状动脉的方法复制大鼠心肌缺血再灌注模型。IPC组行3次缺血5min,再灌注10min的预处理,缺血再灌注(IR)组与IPC组行30min缺血及120min再灌注;对照组不结扎左冠状动脉。电镜观察心肌超微结构,据Rainio评分标准进行心肌超微结构损伤程度的半定量分析,随机选取20个低倍视野,计算平均心肌细胞凋亡数。采用RT-PCR和Western印迹法检测心肌中UCP2的表达。**结果:** IPC组Rainio评分和心肌细胞凋亡率均低于IR组($P<0.05$),IPC组的UCP2 mRNA和蛋白表达水平均较IR组明显增加($P<0.01$)。**结论:** IPC可减轻心肌超微结构损伤程度和减少细胞凋亡,IPC可诱导UCP2表达,提示UCP2可能参与了IPC的心肌保护作用。

关键词 心肌;缺血预适应;解偶联蛋白2;心肌超微结构

中图分类号:R49,R541.4 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2007)-03-0238-03

The expression of uncoupling protein-2 on myocardium of rats following ischemic preconditioning/HUANG Zhaoqi, JIANG Shisen, LU Lei, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(3): 238—240

Abstract Objective: To discuss the role of uncoupling protein 2 (UCP2) in myocardium with ischemic preconditioning (IPC). **Method:** The model of myocardial ischemia reperfusion injury in rats was established by ligation of left coronary artery. Myocardium of rats in both ischemic reperfusion (IR) and IPC groups were subjected to 30min of ischemia followed by 120min of reperfusion. And the myocardium in IPC group was subjected to three episodes of 5min of ischemia coupled to 10min of reperfusion. The ultrastructural changes were observed under electron microscopy and the apoptosis ratio of cardiomyocyte was also determined. The content of UCP2 in mitochondria was tested by Western blot and RT-PCR. **Result:** In IPC group the apoptosis ratio of cardiomyocyte markedly decreased and the ultrastructural damage attenuated ($P<0.05$). UCP2 was induced following ischemic preconditioning ($P<0.05$, vs. IR). **Conclusion:** UCP2 is overexpressed following ischemic preconditioning, and it may be involved in the mechanism of the cardioprotection induced by IPC.

Author's address Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, 510150

Key words myocardium; ischemic preconditioning; uncoupling protein 2; myocardial ultrastructure

心肌缺血预适应是最为有效的内源性心肌保护机制,其机制还不十分清楚。近年研究表明,解偶联蛋白-2(uncoupling protein 2,UCP2)是一种心肌保护蛋白,与心肌能量代谢和心肌细胞凋亡关系密切,在心肌病理生理过程中有着极其重要的作用。但UCP2在心肌缺血预适应中的作用如何,尚未见报道。本研究的目的是探讨UCP2在心肌缺血预适应中的表达及作用。

1 材料与方法

1.1 试验动物

成年雄性SD大鼠体重为 380 ± 10 g,12周龄,来源于南京军区南京总医院实验动物中心。

1.2 实验仪器

TKR-200C小动物呼吸机(江苏省特力麻醉呼吸设备公司)、JY96-II超声波细胞粉碎机(宁波新芝

生物科技股份有限公司)、冷冻离心机(Fresco,德国)、PTC-100™ PCR仪(美国MJ司)、电泳仪、电泳槽及电转移槽(Hoefer,美国)、KODAK ID3.5 DC290凝胶成像分析系统(南京冷泉港)。

1.3 试剂

Tripure (Roche,瑞士)、DNase、M-MLV逆转录酶、dNTPmix、TaqDNA聚合酶、RNasin、oligo(dT)15 (Promega,美国)、PVDF膜(Amersham Pharmacia,美国)、小牛血清白蛋白(HyClone,美国)、UCP2多克隆抗体、抗辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG二抗(Santa Cruz,美国),其余试剂均为国产分析纯。

1.4 实验方法

1 广州医学院第三附属医院心内科,广州市多宝路63号,510150

2 南京军区南京总医院心脏内科

作者简介:黄兆琦,女,博士,住院医师

收稿日期:2006-06-19

1.4.1 实验动物的模型制备和分组: 18只SD大鼠术前12h禁食,自由饮水,使用随机数字表进行随机化分组,分别为对照组、缺血再灌注组(ischemic reperfusion, IR)及预处理组(ischemic preconditioning, IPC)。对照组大鼠开胸后不结扎左冠状动脉;IR组开胸后结扎左冠状动脉30min,松开结扎线120min行再灌注;IPC组行3次缺血5min,再灌注10min的预处理,余过程同IR组。

SD大鼠腹腔注射1%氯胺酮(10mg/kg)麻醉,行气管切开接小动物呼吸机,记录肢体II导联心电图,切除第4前肋进胸,以左心耳下缘与肺动脉圆锥之间的左冠状静脉(与左冠状动脉伴行)为标志,在其根部下方约2—3mm穿结扎线,结扎成功标志为同步心电图标准II导联ST段抬高,QRS幅度升高及结扎线以下左室前壁出现发绀。30min后剪断结扎线即发生再灌注,复灌时左室前壁缺血区发绀消失。

1.4.2 心肌超微结构的观察: 实验完毕后三组皆取结扎线与心尖部中点处心肌组织固定于2.5%戊二醛4h,1%锇酸再固定2h,醋酸铀及硝酸铅双重电子染色后,采用单盲法观察心肌超微结构,据Rainio等^[4]的评分标准,进行心肌细胞超微损伤程度的半定量分析。评分<5分为轻度,5—10分为中度,>10分为重度。随机选取20个低倍视野,统计心肌细胞总数及凋亡细胞的数量,计算平均心肌细胞凋亡数。

1.4.3 UCP2RNA的检测: 取左室前壁缺血心肌约50mg,按Tripure Isdation Reagent操作步骤提取并纯化总RNA约100μg,其A260/280为1.9左右,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析,18S、28S条带清晰,总RNA片断完整未降解。

UCP2的引物参考Gene bank所报道的cDNA,参照文献^[2],计算机辅助设计引物序列,由上海博亚生物技术有限公司合成,序列如下:

引物UCP2上游引物序列5'-AACAGTTCTACACCAAGGGC-3'长度472bp

引物UCP2下游引物序列5'-AGCATGTAAGGGCAGTG-3'长度472bp

逆转录反应以提取的总RNA10μg为模板,Random Primer为引物,70℃水浴5min后迅速冷却,然后每1μg mRNA加入逆转录酶M-MLV100U,总反应体积25μl,42℃下孵育1h,合成第一条cDNA链。PCR反应以逆转录产物10μl为模板,目的基因引物300nmol/L,加入TaqDNA聚合酶2.5U,总反应体积25μl,反应条件为94℃变性模板2min,然后开始循环:94℃变性45s,58℃退火50s,72℃延伸70s,重复30个循环。末次循环后,在延伸温度下再延

7min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后,与PCRLadder分子量比较鉴定。凝胶电泳结果用KODAK ID3.5 DC290凝胶成像分析软件检测电泳条带的光密度吸收,以β-actin基因RT-PCR产物Aβ-actin值为100%,以各自的基因A/Aβ-actin比值表示各自目的基因mRNA的相对含量。

1.4.4 线粒体UCP2蛋白的检测: 取左室前壁缺血心肌50mg,按文献说明在4℃下提取心肌线粒体^[3],考马斯亮蓝比色法(Bradford法^[4])测定总蛋白含量,蛋白样进行12% SDS—PAGE电泳分离,半干法转印至PVDF膜,5%脱脂奶粉包被过夜,一抗(1:800)室温共孵1h,PBST洗5次,再用1:2000的辣根过氧化物酶标记的二抗抗体孵育1h,PBST洗5次,配制发光底物液铺于PVDF膜上,室温放置1min,X光胶片曝光1—5min,将曝光条带经图像扫描仪进行密度扫描。用凝胶成像系统分析条带的灰度值和滞后带面积,二者的乘积(积分吸光度值)表示UCP2的含量。将对照组积分吸光度值设为1,其他各组的值与对照组的比值表示。

1.5 统计学分析

所有的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 11.0用于统计学分析。组间比较采用F检验及q检验,秩和检验且行两两比较,P<0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 心肌细胞超微结构损伤程度

对照组:心肌肌原纤维排列整齐,闰盘清晰,肌丝清晰。线粒体串珠样排列,形态大小正常,包膜完整,嵴密集、清楚、规则排列(见图1)。IR组:肌原纤维排列紊乱,部分断裂、溶解、消失,肌节不清晰,有一定程度的断裂。线粒体变性,排列紊乱,明显肿胀,部分包膜破裂,嵴模糊、断裂、溶解,或呈絮状改变,部分空泡变性(见图2)。IPC组:肌原纤维排列略紊乱,部分线粒体轻度肿胀,大部分线粒体嵴尚完好,小部分呈絮状改变(见图3)。

2.2 心肌细胞Rainio评分结果和心肌细胞凋亡率

IPC组Rainio评分低于IR组(P<0.05)(见表1)。IR组和IPC组均可发现一定数量的凋亡心肌细胞,凋亡率分别为10.6%±0.8%和3.4%±0.5%,IPC组明显低于IR组(P<0.05)。

表1 心肌超微结构Rainio评分和细胞凋亡率

组别	Rainio分	凋亡率(%)
对照组	3.6±0.7	0.0±0.0
IR组	21.2±3.4 ^①	10.6±0.8 ^①
IPC组	12.4±2.9 ^②	3.4±0.5 ^②

①与对照组比较P<0.05;②与IR组比较P<0.05

2.3 心肌 UCP2 的表达

在所得的扩增产物中, 我们都见到了 472bp 和 751bp 的两个条带, 相应于 UCP2 和 β -actin。IPC 组的 UCP2 mRNA 表达水平则较 IR 组明显增加, 有极

显著差异 ($P < 0.01$) (见图 4)。与 UCP2 mRNA 水平的变化相平行, IPC 组的 UCP2 蛋白表达水平则较 IR 组明显增加, 有极显著差异 ($P < 0.01$) (见图 5)。

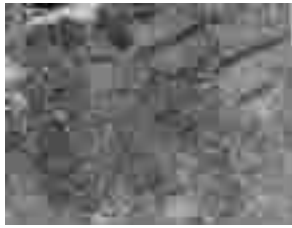


图 1 对照组大鼠心肌超微结构电镜 ($\times 20000$)

肌节排列整齐, 线粒体形态大小正常, 嵴清楚



图 2 IR 组大鼠心肌超微结构电镜 ($\times 20000$)

肌原纤维断裂、溶解、消失, 线粒体明显肿胀, 部分包膜破裂, 嵴减少和消失, 部分空泡变性。



图 3 IPC 组大鼠心肌超微结构电镜 ($\times 20000$)

肌原纤维排列基本规则, 部分线粒体轻度肿胀, 嵴密集, 规则。

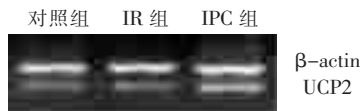


图 4 UCP2 mRNA 的表达情况



图 5 UCP2 蛋白的表达情况

3 讨论

心肌缺血缺氧时, 心肌细胞能量耗竭, 导致心肌细胞结构损伤, 缺血 6min 后, 肌原纤维即出现肿胀; 15min 后, 心肌细胞内糖原轻度减少及线粒体肿胀; 30min 后, 肌浆网扩张, 出现闰盘。1h 后, 线粒体肿胀, 嵴断裂溶解, 血管内皮肿胀, 肌浆网膜部分断裂。早期缺血时线粒体及肌浆网的超微结构的形态改变已被证实是不可逆转的变化^[5]。缺血再灌注时, 重新恢复血流引起大量氧自由基释放, 以及细胞内钙超载使得结构破坏过程加快。郑澄瑜等^[6]发现 IPC 在缺血再灌注过程中, 对心肌细胞膜 PL 有保护作用, 同时电镜观察到 IPC 组心肌超微结构保存较 IR 组保存完整, 提示 IPC 可减轻心肌细胞超微结构损伤的程度。本实验中同样观察到 IR 组的心肌组织超微结构出现明显的损伤, 以线粒体的改变最为明显, 而应用 IPC 则可以明显减轻心肌超微结构损伤程度。

目前认为在心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 中, 细胞凋亡参与了病变的形成。MIRI 后心肌细胞凋亡明显增加, 且随缺血及再灌注时间延长而显著增多, 提示心肌缺血或再灌注过程有促进或加速心肌细胞凋亡的作用。本实验中观察到 IPC 组的心肌细胞凋亡率明显低于 IR 组, 说明 IPC 可减少心肌细胞凋亡, 对 MIRI 具有保护作用。近年来认为心肌 IPC 可抑制和减少心肌细胞的凋亡, 主要机制: ①抑制炎症细胞和非炎症细胞活性氧化物质以及自由基的产生, 即减少凋亡的触发因子; ②直接保护血管内皮, 通过一些黏附分子, 如 CD11、CD18 表达上调, 降低中性粒细胞和内皮细胞的黏附作用; ③改变细胞凋亡的

信号传导通路, 通过改变抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白的表达, 上调 Bcl-2 和下调 p53 基因的表达^[7]。

本实验中观察到 IPC 组 UCP2 mRNA 和蛋白表达均明显增加, 提示 IPC 早期时相即有 UCP2 活性增高。2004 年 McLeod 等发现心肌 IPC 能够诱导 UCP2 mRNA 的表达, 这与本实验结果一致。他们认为心肌 IPC 的晚期保护作用与 UCP2 的表达上调有关, UCP2 表达增加诱导了质子渗漏, 使得 ROS 损伤减轻, 心肌线粒体对缺氧-再氧化的耐受性增强, 从而减轻了 MIRI。因此他们认为 UCP2 是 MIRI 中的心肌内源性保护蛋白^[8]。McLeod 等^[9]还发现 H9C2 细胞中剔除 UCP2 基因则可以消除 IPC 的影响, 进一步证实了 UCP2 在心肌 IPC 晚期时相中具有一定的保护作用。Teshima 等^[10]用腺病毒载体转导培养的新生期心肌细胞, 以氧化应激 (100 μ mol/L H_2O_2) 诱导 UCP2 在细胞中的过量表达, 结果表明 UCP2 可以抑制 ROS 的生成, 增强心肌对氧化应激的耐受力, 防止线粒体 Ca^{2+} 超载, 从而减少线粒体膜电位的丢失, 在心肌细胞的凋亡过程中起了重要作用。

因此我们推测, UCP2 在心肌 IPC 早期时相同样具有心肌保护作用, 可能通过影响 ROS 的生成及产生抗心肌细胞凋亡效应, 从而提高 IPC 后心肌线粒体对 MIRI 的耐受性。刘颖等人发现细胞凋亡的线粒体信号通路在大鼠缺血延迟预适应抗心肌细胞凋亡机制中具有一定作用^[11]。而 UCP2 作为线粒体内膜上的质子通道, 是否在这一抗心肌细胞凋亡机制中发挥了作用尚需进一步研究。

(下转 243 页)