

大鼠心肌缺血后适应对 p38 丝裂原活化蛋白激酶及细胞凋亡的影响

张国明^{1,2}, 苏绍萍³, 王禹⁴, 李天德¹, 李晓燕²,
谈红², 张大为¹, 张慧¹, 刘丽凤¹

¹中国人民解放军总医院心内科, 北京 100853

²中国人民解放军济南军区总医院心内科, 济南 250031

³中国人民解放军总医院门诊部干部诊疗科, 北京 100853

⁴中国人民解放军总医院老年心血管病研究所, 北京 100853

通信作者: 王禹 电话/传真: 010-66936776, 电子邮件: wangyuheart@yahoo.com.cn

摘要: 目的 研究大鼠缺血后适应对 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 及细胞凋亡的影响。方法 将 60 只大鼠随机分为假手术组 (Sham 组)、缺血再灌注组 (R/I 组)、后适应组 (Post 组)、SB203580 组 (I_p38 组)、anisomycin + 后适应组 (Ani + post 组) 和 anisomycin 组 (Ani 组) 6 组, 每组 10 只。建立急性心肌梗死再灌注模型, 抑制剂 (SB203580, 1mg/kg) 和激动剂 (anisomycin, 2mg/kg) 在再灌注开始前 5 min 经颈静脉注射。再灌注 6 h 后, 每组处死 3 只大鼠, 取心肌组织测定磷酸化 p38 (P-p38)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、Caspase-8、Bcl-2 和 Bax, 并提取胞浆测定细胞色素 C (Cyt-c)。再灌注 24 h 后, 各组剩余大鼠测定血流动力学, 并抽血测定心肌酶, 取心脏进行 TUNEL 凋亡检测或采用伊文氏蓝-三苯基氯化四氮唑法检测心肌梗死面积。**结果** 再灌注 6 h 后, Post 组和 I_p38 组的 P-p38 MAPK IOD 值明显低于 R/I 组 (P 均 < 0.05), Ani + post 组和 Ani 组明显高于 Post 组 (P 均 < 0.05), Ani + post 组明显低于 R/I 组 ($P < 0.05$); Post 组和 I_p38 组的 TNF- α 和 Caspase-8 IOD 值均明显低于 R/I 组 (P 均 < 0.05), Ani + post 组和 Ani 组均明显高于 Post 组 (P 均 < 0.05), Ani + post 组的 TNF- α IOD 值明显低于 R/I 组 ($P < 0.05$); Post 组和 I_p38 组的 Bcl-2 IOD 值明显高于 R/I 组 (P 均 < 0.05), Ani + post 组和 Ani 组明显低于 Post 组 (P 均 < 0.05); Post 组和 I_p38 组的 Bax IOD 值明显低于 R/I 组 (P 均 < 0.05), Ani + post 组和 Ani 组明显高于 Post 组 (P 均 < 0.05); 去除线粒体后胞浆中 Cyt-c 的表达, Post 组和 I_p38 组明显低于 R/I 组 (P 均 < 0.05), Ani + post 组和 Ani 组明显高于 Post 组 (P 均 < 0.05)。再灌注 24 h 后, R/I 组的心率血压乘积 (RPP) 和左心室压力最大上升/下降速度 ($\pm dp/dt$ max) 均明显低于 Post 组和 I_p38 组 (P 均 < 0.05), Post 组明显高于 Ani + post 组和 Ani 组 (P 均 < 0.05); Post 组和 I_p38 组的 AI 明显低于 R/I 组 (P 均 < 0.05), Ani + post 组和 Ani 组明显高于 Post 组 (P 均 < 0.05); Post 组、I_p38 组和 Ani + post 组的 CK 和 CK-MB 值均明显低于 R/I 组 (P 均 < 0.05), Ani + post 组和 Ani 组均明显高于 Post 组 (P 均 < 0.05); Post 组和 I_p38 组的梗死心肌面积和缺血心肌面积比值 (AN/AAR) 明显低于 R/I 组 (P 均 < 0.05), Ani + post 组和 Ani 组明显高于 Post 组 (P 均 < 0.05)。**结论** 后适应可抑制 p38 MAPK 在再灌注损伤中的磷酸化, 其可能是通过减少 P-p38 来抑制 TNF- α 细胞受体途径和 Bcl-2/Bax 线粒体途径凋亡的发生。

关键词: 缺血后适应; 急性心肌梗死; 再灌注损伤; p38 丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号: R541.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-503X(2010)05-0526-07

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2010.05.012

Effect of Ischemic Postconditioning on Activation of p38 Mitogen Activated Protein Kinase and Cardiocyte Apoptosis in Rats

ZHANG Guo-ming^{1,2}, SU Shao-ping³, WANG Yu⁴, LI Tian-de¹, LI Xiao-yan²,
Tan Hong², ZHANG Da-wei¹, ZHANG Hui¹, LIU Li-feng¹

¹Department of Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

²Department of Cardiology, the General Hospital of Jinan Military Region, Jinan 250031, China

³Department of Outpatient, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

⁴Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: WANG Yu Tel/Fax: 010-66936776, E-mail: wangyuheart@yahoo.com.cn

ABSTRACT: Objective To explore the change of phospho-p38 (P-p38) mitogen activated protein kinase (MAPK) and its influence on myocardial apoptosis in reperfusion injury in postconditioning. **Methods** Totally 60 rats were equally and randomly divided into six groups: Sham group, reperfusion injury (R/I) group, postconditioning (Post) group, SB203580 (I_p38) group, anisomycin plus postconditioning (Ani + post) group, and anisomycin (Ani) group. After the model of acute myocardial infarction was established, placebo solution (DMSO), SB203580 (1mg/kg), or anisomycin (2mg/kg) was injected through jugular vein 5 minutes before reperfusion. Six hours later, 3 rats in each group were executed and the hearts were separated to measure the signaling molecules including phospho-p38, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), Caspase-8, Bcl-2/Bax, and cytochrome-c (Cyt-c). Twenty-four hours later, the hemodynamic data were measured in the remaining rats, and then blood was collected to determine the serum markers of cardiac damage. After that, hearts were separated to measure the infarction area and apoptosis. **Results** Six hours after reperfusion, the expressions of P-p38 in Post and I_p38 group were significantly lower than those in R/I group ($P < 0.05$), significantly higher in Ani + post and Ani group than in Post group ($P < 0.05$), and significantly lower in Ani + post group than in R/I group ($P < 0.05$). The expressions of TNF- α and Caspase-8 were significantly lower in Post and I_p38 group than in R/I group ($P < 0.05$) and significantly higher in Ani + post and Ani group than in Post group ($P < 0.05$). The expression of TNF- α was significantly lower in Ani + post group than in R/I group ($P < 0.05$). The expression of Bcl-2 was significantly higher in Post and I_p38 groups than in R/I group ($P < 0.05$) and significantly lower in Ani + post and Ani groups than in Post group ($P < 0.05$). The expression of Bax was significantly lower in Post and I_p38 groups than in R/I group ($P < 0.05$) and were significantly higher in Ani + post and Ani group than in Post group ($P < 0.05$). The expression of Cyt-c after the removal of the cytoplasm mitochondria was significantly lower in Post and I_p38 group than in R/I group ($P < 0.05$) and was significantly higher in Ani + post and Ani group than in Post group ($P < 0.05$). Twenty-four hours after reperfusion, the values of rate-pressure product and \pm delta pressure/delta time max were significantly lower in R/I group than in Post and I_p38 groups ($P < 0.05$) and was significantly higher in Post group than in Ani + post and Ani group ($P < 0.05$). The apoptotic index (AI) was significantly lower in Post and I_p38 groups than in R/I group ($P < 0.05$) and was significantly higher in Ani + post and Ani groups than in Post group ($P < 0.05$). The values of creatine kinase and creatine kinase-MB were significantly lower in Post, Ani + post, and I_p38 groups than in R/I group ($P < 0.05$) and were significantly higher in Ani + post and Ani group than in Post group ($P < 0.05$). The area of necrosis/area at risk ratio was significantly lower in Post and I_p38 groups than in R/I group ($P < 0.05$) and was significantly higher in Ani + post and Ani groups than in Post group ($P < 0.05$). **Conclusion** Postconditioning can inhibit the phosphorylation of p38 MAPK,

through which it can attenuate cardiocyte apoptosis by both extrinsic and mitochondria pathways.

Key words: postconditioning; acute myocardial infarction; reperfusion injury; p38 mitogen activated protein kinase

Acta Acad Med Sin, 2010, 32(5): 526-532

迅速有效恢复血供是治疗急性心肌梗死的主要方法,但也可带来再灌注损伤^[1]。2003年,Zhao等^[2]研究发现,缺血后适应可调动内源性心脏保护机制,显著降低心肌梗死面积,是一种有效减轻再灌注损伤的治疗策略^[3-4]。目前认为,后适应可通过激活再灌注损伤存活激酶,继而激活ATP敏感性钾通道,最后抑制线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)的开放^[5-7]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)是重要的跨膜信号传导通路,可在细胞增殖、分化和凋亡中发挥重要作用,主要由4个家族成员组成:细胞外信号调节的蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2)、应激活化蛋白激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、P38 MAPK和ERK5,其中p38 MAPK可被应激、高渗透压、缺氧、电离辐射等多种刺激因素所激活,多项研究证实,p38 MAPK激活后可导致多种器官的细胞凋亡,从而加重损伤^[8-9]。目前对p38 MAPK在后适应中的作用研究较少,且结论并不一致^[10-11]。本研究采用活体大鼠心肌梗死再灌注模型,观察了后适应处理后磷酸化p38 MAPK的变化情况,并使用p38 MAPK特异性抑制剂(SB203580)和激活剂(anisomycin)进行验证,以期探讨其在后适应中的信号传导作用及对心肌细胞凋亡的影响。

材料和方法

材料与试剂 健康雄性SPF级SD大鼠60只,购自军事医学科学院实验动物中心,许可证号SCXK 2(军)2007-004,体重200~250 g。SB203580(粉剂,1 mg/支)和anisomycin(粉剂,10 mg/支)购自德国默克公司;兔抗小鼠磷酸化p38(phospho-p38, P-p38)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、Caspase-8、Bcl-2、Bax、细胞色素C(cytochrome-c, Cyt-c)多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,相应二抗购自瑞典Amersham公司;凋亡试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;其余化学试剂为国产分析纯产品。

大鼠心肌梗死再灌注模型建立 参照赵秀梅等^[12]

的球囊扎法建立大鼠在体心肌梗死后再灌注模型,具体为:大鼠称重,以2%戊巴比妥钠(0.23 ml/100 g)行腹腔注射麻醉。仰卧固定,颈部正中切口,插入气管插管,以HX-200型动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司)辅助呼吸(潮气量30 ml/kg,频率50~60次/min,吸呼比1:2)。剪开颈部皮肤,分离右颈静脉备用。开胸后暴露心脏,剪开心包,在左心耳下缘与肺动脉圆锥间用5-0无创带针缝合线穿过前降支深部,将充盈后扩张球囊(Grip, 3.0 × 12 mm,瑞士Acrostak公司,压力调为101.325 kPa)垫于血管与结扎线之间,用力结扎,而后将压力泵压力调节为1 215.9 kPa。缺血40 min时,通过右颈静脉根据分组注射不同注射药物。缺血45 min后,将压力泵压力迅速调为101.325 kPa,根据分组给予不同处理,而后以3-0丝线缝合胸腔和胸部皮肤。待大鼠苏醒后拔除气管插管,缝合气管和颈部皮肤,给予正常饮食。术后6 h(每组3只)、24 h(每组7只),以20%乌拉坦(0.8 ml/100 g)腹腔注射麻醉,经右颈总动脉插入左心室导管,采用生物信号及压力测试系统(MFL lab 200,复旦大学医学院生理教研室研制)监测主动脉及左心室血流动力学参数。通过颈动脉插管抽取动脉血3~4 ml,根据所测指标不同给予不同处理:(1)Western blot检测:使用术后6 h处死者(3只),取出心脏后切掉心房和右心室,液氮冷冻后置于-80℃冰箱保存;(2)心肌梗死面积测定:使用术后24 h者(4只),抽血后经颈动脉插管注入伊文斯蓝染色;(3)凋亡检测:使用术后24 h者(3只),取出心脏置于中性甲醛固定24 h。

实验分组 将60只SD大鼠随机分为6组,每组10只;除假手术组(Sham组)外,各组均缺血45 min,而后根据分组不同给予后处理或持续再灌注:(1)Sham组:开胸,分离左冠状动脉并穿线,不结扎,旷置45 min,在穿线后40 min时通过右颈静脉注射0.8 ml 10% DMSO;(2)缺血再灌注组(R/I组):缺血40 min时通过右颈静脉注射0.8 ml 10% DMSO,缺血结束后恢复持续再灌注;(3)后适应组(Post组):缺血40 min时通过右颈静脉注射0.8 ml 10% DMSO,缺血结束后、再灌注前通过球囊放气-充盈实现20 s再灌注和20 s缺血,反复4轮后,持续再灌注;

(4) SB203580 组 (I_p38 组): 缺血 40 min 时通过右颈静脉注射 SB203580 (1 mg/kg, 溶于 10% DMSO 0.8 ml), 缺血结束后持续再灌注; (5) anisomycin + 后适应组 (Ani + post 组): 缺血 40 min 时, 通过右颈静脉注射 anisomycin (2 mg/kg, 溶于 10% DMSO 0.8 ml), 缺血结束后再灌注前通过球囊充气-充盈实现 20 s 再灌注和 20 s 缺血, 反复 4 轮后, 持续再灌注; (6) anisomycin 组 (Ani 组): 缺血 40 min 时通过右颈静脉注射 anisomycin (2 mg/kg, 溶于 10% DMSO 0.8 ml), 缺血结束后持续再灌注 (图 1)。

凋亡检测 再灌注 24 h 麻醉经颈动脉取血后, 取出心脏, 将缺血区心肌组织 (左心室前壁中间段) 剪下, 10% 中性甲醛固定 24 h, 常规石蜡包埋, 采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 法, 按照试剂盒说明进行心肌组织切片细胞凋亡的原位检测。光镜下正常心肌细胞核呈蓝绿色, 凋亡细胞核呈深浅不一的棕褐色。每张切片于凋亡细胞分布区域各取 5 个高倍视野, 计算出平均每 100 个细胞中的凋亡细胞数, 并以百分数 (%) 表示凋亡指数 (apoptotic index, AI)。

心肌酶测定 经动脉插管抽取动脉血, 3 000 r/min 离心 15 min 后分离留上清, 液氮冷冻后 -80℃ 冰箱保存, 而后送中国人民解放军总医院生化科以

全自动生化分析仪 (日本日立公司) 测定肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 和肌酸激酶-MB (creatine kinase-MB, CK-MB) 活性。

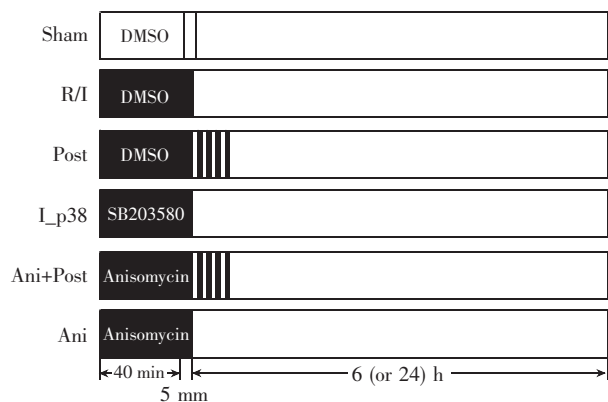
心肌梗死面积测定 再灌注 24 h 麻醉经颈动脉取血后, 将颈动脉插管回抽 (从左心室回撤约 5 mm) 至主动脉, 开胸将制作心肌梗死模型时的原结扎丝线再次结扎, 经颈动脉插管缓慢注入 1% 伊文氏蓝 3~5 ml, 将非缺血心肌染成蓝色, 从而显示缺血区心肌。染色 10 min 后, 取出心脏置于 -20℃ 冰箱约 20 min, 冷冻后按垂直于左心室长轴方向切片 (厚约 2 mm), 置入 2% TTC 磷酸缓冲液 (pH7.4) 中, 37℃ 孵育 20 min。此时梗死区呈灰白色, 即为梗死心肌面积 (area of necrosis, AN); 缺血非梗死区呈砖红色, 缺血心肌面积 (area at risk, AAR) 为灰白色和砖红色之和, 置于图像采集系统扫描后, 采用 Image-Pro Plus 图像分析软件 (Version 4.1, Media Cybernetics, LP, USA) 分别计算各部分面积。缺血心肌用 AAR 与左心室 (left ventricular, LV) 面积之比表示, 梗死范围以 AN 与 AAR 之比表示。

Western blot 再灌注 6 h 后取出心脏冷冻, 提取心肌组织总蛋白, 蛋白提取液上清 (含蛋白 100 μg) 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将电泳分离后的蛋白质电转移至硝酸纤维素膜上, 经封闭、洗脱后分别加入 P-p38 MAPK、TNF-α、Caspase-8、Bcl-2、Bax、β-actin 多克隆抗体 (均为 1:200), 室温孵育 4 h, 洗膜后以相应的二抗室温孵育 1 h。抗原抗体复合物用 ECL 法显示, 暗室 X 光胶片曝光, 采用 Image-Pro Plus 图像分析软件分析蛋白条带的积分光密度值 (integrated optical density, IOD), IOD = 平均光密度值 × 面积, 以靶蛋白 IOD/β-actin IOD 的比值反映靶蛋白相对水平。Cyt-c 的测定参照 Li 等^[13]的方法, 首先采用心肌组织差速离心法去除组织线粒体, 上清液即为胞浆, 胞浆进行蛋白定量后按上述组织 Western blot 方法进行电泳、转膜、免疫反应、显色和分析。

统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间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。

结 果

P-p38 的表达情况 再灌注 6 h 后, Sham 组、R/I 组、Post 组、I_p38 组、Ani + post 组和 Ani 组 P-



Sham: 假手术组; R/I: 缺血再灌注组; Post: 后适应组; I_p38: SB203580 组; Ani + Post: anisomycin + 后适应组; Ani: anisomycin 组

Sham: sham group; R/I: reperfusion injury group; Post: post-conditioning group; I_p38: SB203580 group; Ani + Post: anisomycin + postconditioning group; Ani: anisomycin group

图 1 实验各组处理模式图 (黑色代表缺血, 白色代表灌注)

Fig 1 Time-lines of the experimental protocols (black means ischemia and white means reperfusion)

p38 MAPK 的 IOD 值分别为 0.80 ± 0.23 、 1.70 ± 0.37 、 1.10 ± 0.12 、 1.12 ± 0.18 、 1.40 ± 0.22 和 1.90 ± 0.26 ，其中 Post 组和 I_p38 组明显低于 R/I 组 (P 均 < 0.05)；Ani + post 组和 Ani 组明显高于 Post 组 (P 均 < 0.05)；Ani + post 组明显低于 R/I 组 ($P < 0.05$)，而 Ani 组与 R/I 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

TNF- α and Caspase-8 的表达情况 再灌注 6 h 后，Sham 组、R/I 组、Post 组、I_p38 组、Ani + post 组和 Ani 组的 TNF α 和 Caspase-8 IOD 值分别为 0.70 ± 0.10 和 0.70 ± 0.10 、 3.00 ± 0.30 和 2.30 ± 0.30 、 1.00 ± 0.30 和 1.00 ± 0.30 、 0.89 ± 0.21 和 1.02 ± 0.21 、 2.00 ± 0.10 和 2.40 ± 0.10 、 3.00 ± 0.10 和 2.60 ± 0.10 ，其中，Post 组和 I_p38 组均明显低于 R/I 组 (P 均 < 0.05)；Ani + post 组和 Ani 组均明显高于 Post 组 (P 均 < 0.05)；Ani + post 组的 TNF- α IOD 值明显低于 R/I 组 ($P < 0.05$)，其 Caspase-8 IOD 值与 R/I 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

Bcl-2/Bax 和 Cyt-c 的表达情况 再灌注 6 h 后，Sham 组、R/I 组、Post 组、I_p38 组、Ani + post 组和 Ani 组的 Bcl-2 和 Bax IOD 值分别为 0.43 ± 0.10 和 0.39 ± 0.10 、 0.80 ± 0.3 和 1.00 ± 0.30 、 1.40 ± 0.30 和 0.50 ± 0.30 、 1.20 ± 0.21 和 0.45 ± 0.21 、 0.67 ± 0.10 和 1.23 ± 0.10 、 0.78 ± 0.10 和 1.20 ± 0.10 ，其中，Post 组和 I_p38 组的 Bcl-2 IOD 值明显高于 R/I 组 (P 均 < 0.05)；Ani + post 组和 Ani 组明显低于 Post 组 (P 均 < 0.05)，与 R/I 组相比则差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。Post 组和 I_p38 组的 Bax IOD 值明显低于 R/I 组 (P 均 < 0.05)；Ani + post 组和 Ani 组明显高于 Post 组 (P 均 < 0.05)。去除线粒体后胞浆中 Cyt-c 的表达，Sham 组、R/I 组、

Post 组、I_p38 组、Ani + post 组和 Ani 组的 IOD 值分别为 0.12 ± 0.02 、 1.00 ± 0.11 、 0.33 ± 0.04 、 0.48 ± 0.20 、 0.76 ± 0.11 和 1.12 ± 0.20 ，其中 Post 组和 I_p38 组明显低于 R/I 组 (P 均 < 0.05)，Ani + post 组和 Ani 组均明显高于 Post 组 (P 均 < 0.05)。

血流动力学检测结果 各组大鼠再灌注 24 h 后的心率和平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP) 差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)；R/I 组的心率血压乘积 (rate-pressure product, RPP)、压力最大上升速率 (+ delta pressure/delta time max, + dp/dt max) 和压力最大下降速率 (-delta pressure/delta time max, -dp/dt max) 均明显低于 Post 组和 I_p38 组 (P 均 < 0.05)，Post 组明显高于 Ani + post 组和 Ani 组 (P 均 < 0.05)，Ani + post 组和 Ani 组与 R/I 组间差异无统计学意义 (P 均 > 0.05) (表 1)。

心肌细胞凋亡情况 再灌注 24 h 后，Sham 组很少见到 TUNEL 染色阳性的凋亡细胞，R/I 组的凋亡细胞则明显增多 (图 2)。Post 组和 I_p38 组的 AI 分别为 $(5.56 \pm 1.12)\%$ 和 $(8.33 \pm 4.12)\%$ ，明显低于 R/I 组的 $(18.22 \pm 5.10)\%$ (P 均 < 0.05)；Ani + post 组和 Ani 组分别为 $(14.12 \pm 2.00)\%$ 和 $(18.10 \pm 4.00)\%$ ，明显高于 Post 组 $(5.56 \pm 1.12)\%$ (P 均 < 0.05)，与 R/I 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

Post 组、I_p38 组和 Ani + post 组的 CK 值分别为 (328.56 ± 132.00) 、 (473.03 ± 178.01) 和 (986.96 ± 198.02) U/L，明显低于 R/I 组的 (1327.16 ± 243.09) U/L (P 均 < 0.05)；CK-MB 值分别为 (201.16 ± 112.41) 、 (285.53 ± 104.35) 和 (693.36 ± 102.35) U/L，也明显低于 R/I 组的 (928.03 ± 276.00) U/L (P 均 < 0.05)。Ani + post 组和 Ani 组的 CK 值分别为 (986.96 ± 198.02) 和 (1389.36 ± 190.00) U/L，明

表 1 各组再灌注 24 h 血流动力学比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 1 Comparison of hemodynamic data 24 hours after reperfusion among all groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

分组 Group	HR (bpm)	MAP (mmHg)	RPP (1 000 · bpm · mmHg)	+ dp/dt max (mmHg/s)	-dp/dt max (mmHg/s)
Sham	488.15 ± 20.90	123.23 ± 13.34	60.15 ± 0.28 ^a	1 019.09 ± 318.65 ^a	752.31 ± 231.05 ^a
R/I	425.94 ± 69.60	103.33 ± 14.23	44.01 ± 0.99 ^b	526.37 ± 123.99 ^b	445.44 ± 79.58 ^b
Post	425.94 ± 25.97	133.89 ± 20.76	57.03 ± 0.54 ^a	855.42 ± 150.54 ^a	645.90 ± 132.24 ^a
I _p 38	429.00 ± 65.93	123.33 ± 11.21	52.91 ± 0.74 ^a	829.51 ± 87.79 ^a	625.23 ± 141.39 ^a
Ani + post	389.85 ± 31.23	126.20 ± 14.56	49.19 ± 0.45 ^b	564.41 ± 101.19 ^b	470.85 ± 54.85 ^b
Ani	397.21 ± 36.03	101.57 ± 10.36	40.34 ± 0.37 ^b	507.36 ± 62.55 ^b	425.89 ± 40.67 ^b

Sham: 假手术组; R/I: 缺血再灌注组; Post: 后适应组; I_p38: SB203580 组; Ani + post: anisomycin + 后适应组; Ani: anisomycin 组; HR: 心率; MAP: 平均动脉压; RPP: 心率血压乘积; + dp/dt: 压力最大上升速率; -dp/dt: 压力最大下降速率; 1mmHg = 0.133kPa; 与 R/I 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 Post 组比较, ^b $P < 0.05$

Sham: sham group; R/I: reperfusion injury group; Post: postconditioning group; I_p38: SB203580 group; Ani + post: anisomycin + postconditioning group; Ani: anisomycin group; HR: heart rate; MAP: mean arterial pressure; RPP: rate-pressure product; + dp/dt: + delta pressure/delta time; -dp/dt: -delta pressure/delta time; 1mmHg = 0.133kPa; ^a $P < 0.05$ compared with R/I group; ^b $P < 0.05$ compared with Post group

显高于 Post 组的 (328.56 ± 132.00) U/L (P 均 < 0.05); CK-MB 值分别为 (693.36 ± 102.35) 和 (997.08 ± 253.21) U/L, 也均明显高于 Post 组的 (201.16 ± 112.41) U/L (P 均 < 0.05)。

心肌梗死面积 R/I 组、Post 组、I_p38 组、Ani + post 组和 Ani 组的 AAR/LV 值分别为 52.38 ± 9.21 、 51.75 ± 8.67 、 51.01 ± 7.82 、 51.30 ± 7.89 和 52.25 ± 8.21 , 各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); AN/AAR 值分别为 42.31 ± 8.21 、 18.57 ± 6.32 、 22.61 ± 8.12 、 35.27 ± 5.23 和 40.23 ± 8.10 , 其中 Post 组和 I_p38 组明显低于 R/I 组 (P 均 < 0.05), Ani + post 组和 Ani 组明显高于 Post 组 (P 均 < 0.05)。

讨 论

多项研究证实, 缺血后适应能有效减轻再灌注损伤; 凋亡是再灌注损伤的重要原因, 而 p38 MAPK 激活后可导致多种器官的细胞凋亡, 所以本研究从细胞凋亡及其影响途径和 P-p38 MAPK 的表达入手, 探讨了后适应对 p38 MAPK 活化的影响。结果发现, Post 组较 R/I 组心肌凋亡显著减少, 同时 P-p38 MAPK 表达显著降低。为进一步确认后适应中 p38 MAPK 的变化及其作用, 本研究使用了特异性抑制剂 SB203580 和激活剂 anisomycin, 结果发现, SB203580 可以模拟后适应的心脏保护作用, 而 p38 激活剂 anisomycin 则可部分抵消后适应带来的保护效应; 如果单纯给予 anisomycin 而不进行后适应干预, 则其损伤作用与 R/I 组类似。这也从侧面证实了再灌注损伤作为一种应激可以激活 p38 MAPK, 而后适应则可有效抑制这一过程, 继而减轻细胞凋亡的发生。

已知后适应能减轻再灌注损伤, 而再灌注损伤中心肌梗死由坏死和凋亡两种形式组成。Kunapuli 等^[14]研究显示, 后适应可在减轻心肌酶释放的同时, 有效减轻心肌细胞凋亡, 凋亡的发生主要是通过细胞受体途径和线粒体途径所激活。本研究结果显示, Post 组和 I_p38 组细胞凋亡指数较 R/I 组明显降低, 且同凋亡途径信号分子的激活表现出较为一致的不同步变化, 进一步证实了 Kunapuli 等^[14]的结果。TNF- α 是主要的细胞受体途径之一, 可以通过激活细胞膜上相应受体, 进一步激活核因子- κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 等细胞因子, 从而激活凋亡信号瀑布, 最后通过 Caspase-8 和 Caspase-3 的活

化启动凋亡执行程序^[15]。Sun 等^[11]认为, P-p38 MAPK 可上调 TNF- α 的合成, 而 TNF- α 反过来又可促进 p38 MAPK 的合成和活化, 从而形成一个恶性循环使其效应进一步放大。本研究结果显示, Post 组和 I_p38 组 TNF- α 及 Caspase-8 较 R/I 组明显降低, 提示后适应可减少 P-p38 MAPK 的生成, 同时伴随 TNF- α 及 Caspase-8 的降低; SB203580 可抑制 P-p38 MAPK, 部分模拟这种保护作用, anisomycin 则可减弱后适应对 p38 MAPK 的这种抑制作用, 从侧面证明后适应可以通过 p38 MAPK 抑制细胞受体途径的激活。

线粒体途径也是细胞凋亡的重要途径, 多种细胞因子可以影响此途径, 其中 Bcl-2 和 Bax 是一对重要的平衡因子, 其作用相反, Bcl-2 能抑制 mPTP 的开放, 从而阻止线粒体膜间隙的前凋亡因子进入胞浆, 但 Bax 作用恰恰相反, 可促进 mPTP 的开放^[16-18]。本研究显示, P-p38 MAPK 的生成受到抑制时, Bcl-2 表达升高, Bax 表达降低, 说明 p38 MAPK 的活体会抑制 Bcl-2 而促进 Bax 的表达; 后适应和 SB203580 可以通过抑制 p38 MAPK 途径, 进而升高 Bcl-2/Bax 比值, 从而减轻 mPTP 的开放。Cyt-c 是线粒体特异性表达蛋白, 正常状态下胞浆中几乎检测不到, 但当线粒体 mPTP 开放后, Cyt-c 便从线粒体膜间隙转移到胞浆中, 进一步激活各种凋亡酶, 最后激活 Caspase-3 执行凋亡程序, 所以胞浆中 Cyt-c 浓度的高低可侧面反映线粒体 mPTP 的开放程度。本研究结果显示, Post 组和 I_p38 组胞浆中的 Cyt-c 明显低于其他各组, 说明上述两组线粒体凋亡途径激活较弱, 即后适应和 SB203580 可以抑制线粒体途径凋亡的发生, 提示 p38 MAPK 可通过细胞受体和线粒体两条途径影响细胞凋亡, 在后适应减轻细胞凋亡中发挥重要作用。

本研究中, Ani + post 组并没有完全抵消后适应的保护作用, 在凋亡和坏死两方面均为部分抵消, 这说明虽然 p38 MAPK 通过上述两条凋亡途径在后适应中发挥重要作用, 但其只是后适应复杂作用机制中一条可能途径。本研究与 Sun 等^[11]在乳鼠心肌细胞中的研究结果一致, 均认为后适应可抑制 p38 MAPK 的活化, 从而进一步抑制细胞凋亡发生。但也有研究认为某些促凋亡因子能激活 p38 MAPK, 而 p38 MAPK 可反过来抑制凋亡发生, 起到减轻凋亡的代偿作用, 从而与 JNK 形成一对作用相反的平衡因子, 但本研究中使用抑制剂和激动剂并未发现上述

作用,推测可能与检测的 p38 MAPK 时间不同或亚型不同有关。

综上所述,本研究结果显示, p38 MAPK 信号途径的激活在缺血后适应中具有重要意义,通过对 TNF- α 细胞受体途径和 Bcl-2/Bax 线粒体途径的影响,可减轻细胞凋亡发生。

(本文图2见插图第2页)

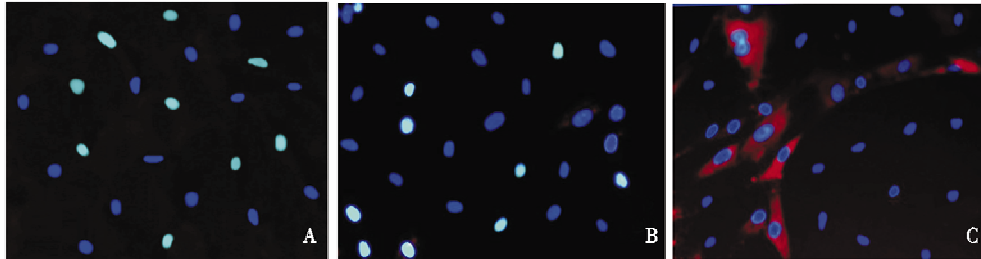
参 考 文 献

- [1] Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction [J]. *Circulation*, 1982, 66(6):1146-1149.
- [2] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, *et al.* Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(2):H579-H588.
- [3] 张永明,王禹,刘秀华,等.依达拉奉药物后处理对急性心肌梗死再灌注损伤保护作用的实验研究[J].*中华医学杂志*, 2008, 88(36):2558-2561.
- [4] 马晓静,张兴华,罗曼,等.缺血预适应与缺血后适应现象对急性心肌梗死急救介入治疗后的影响[J].*中华医学杂志*, 2007, 87(2):114-117.
- [5] Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, *et al.* Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway [J]. *Circ Res*, 2004, 95(3):230-232.
- [6] Yang XM, Proctor JB, Cui L, *et al.* Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44(5):1103-1110.
- [7] Penna C, Mancardi D, Raimondo S, *et al.* The paradigm of postconditioning to protect the heart [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(2):435-458.
- [8] Kaiser RA, Bueno OF, Lips DJ, *et al.* Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(15):15524-15530.
- [9] Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway [J]. *Cell Res*, 2005, 15(1):11-18.
- [10] Liu XH, Zhang ZY, Sun S, *et al.* Ischemic postconditioning protects myocardium from ischemia/reperfusion injury through attenuating endoplasmic reticulum stress [J]. *Shock*, 2008, 30(4):422-427.
- [11] Sun HY, Wang NP, Halkos M, *et al.* Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(9):1583-1593.
- [12] 赵秀梅,孙胜,刘秀华.垫扎球囊法复制大鼠在体心肌缺血/再灌注模型[J].*中国微循环*, 2007, 11(3):206-208.
- [13] Li Y, Ge X, Liu X. The cardioprotective effect of postconditioning is mediated by ARC through inhibiting mitochondrial apoptotic pathway [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(2):164-172.
- [14] Kunapuli S, Rosanio S, Schwarz ER. "How do cardiomyocytes die?" apoptosis and autophagic cell death in cardiac myocytes [J]. *J Card Fail*, 2006, 12(5):381-391.
- [15] Ballard-Croft C, White DJ, Maass DL, *et al.* Role of p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac myocyte secretion of the inflammatory cytokine TNF- α [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280(5):H1970-H1981.
- [16] Wang C, Neff DA, Krolikowski JG, *et al.* The influence of B-cell lymphoma 2 protein, an antiapoptotic regulator of mitochondrial permeability transition, on isoflurane-induced and ischemic postconditioning in rabbits [J]. *Anesth Analg*, 2006, 102(5):1355-1360.
- [17] Degli Esposti M, Dive C. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 304(3):455-461.
- [18] Kuwana T, Newmeyer DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(6):691-699.

(收稿日期:2009-11-20)

成肌性标志物在人骨髓间充质干细胞分化为肌细胞过程中的表达

(正文见第 516 页)



A. 深蓝色为 DAPI 染色细胞核，浅蓝色为 DAPI 与 myogenin 均呈阳性的细胞核；B. 深蓝色为 DAPI 染色细胞核，浅蓝色为 DAPI 与 MyoD 均呈阳性的细胞核；C. 深蓝色为 DAPI 染色细胞核，红色为 desmin 阳性细胞

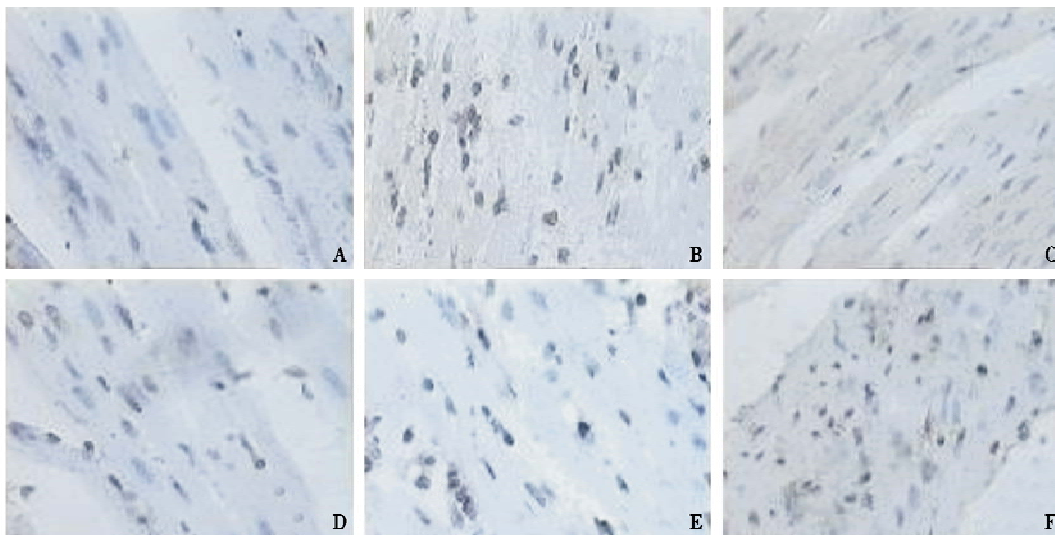
A. myogenin-positive cells co-stained with DAPI (light blue) were observed in the skeletal muscle of mdx mice 12 weeks after hBM-MSCs transplantation, while navy blue (DAPI) indicate myogenin-negative cells; B. MyoD-positive cells co-stained with DAPI (light blue) were showed in skeletal muscle of transplanted mdx mice, and the others were not MyoD-but DAPI-positive (navy blue); C. a number of desmin-positive cells (red) were detected in skeletal muscle of the mdx mice (DAPI counterstained)

图 5 hBM-MSCs 移植后 12 周 mdx 小鼠骨骼肌成肌性标志物免疫荧光检测 (×150)

Fig 5 Immunofluorescent analysis of myogenic marker in the muscle of mdx mice 12 weeks after hBM-MSCs transplantation (×150)

大鼠心肌缺血后适应对 p38 丝裂原活化蛋白激酶及细胞凋亡的影响

(正文见第 526 页)



A. Sham; B. R/I; C. Post; D. L_p38; E. Ani + post; F. Ani

图 2 各组心肌细胞 TUNEL 染色结果，棕褐色为凋亡细胞 (×400)

Fig 2 TUNEL staining results of myocardial cells in all groups, brownish means apoptotic cell (×400)