



白藜芦醇对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的抑制作用与 PI3K-Akt 信号通路的关系

何东伟, 刘新伟*, 庞勇, 刘柳

(重庆医科大学附属第一医院 麻醉科, 重庆 400016)

[摘要] **目的:**探讨白藜芦醇对大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响及与 PI3K-Akt 信号通路的关系。**方法:**50 只成年雄性 SD 大鼠,随机分为 5 组,即对照组(SH 组)、缺血再灌注组(I/R 组)、白藜芦醇预处理组(Res 组)、白藜芦醇预处理 + 渥曼青霉素组(Res + Wom 组)、缺血再灌注 + 渥曼青霉素组(I/R + Wom 组)。结扎冠状动脉左前降支制备心肌缺血模型,缺血 45 min,再灌注 120 min,测定再灌注心肌组织中 NOS,NO 的含量,并用末端脱氧核苷酸转移酶介导的带生物素的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)的方法测定细胞凋亡,免疫组化测定心肌组织中 Bcl-2, Bax 蛋白的表达,利用 Western blot 测定 Akt(又称 PKB,即蛋白激酶 B)及 p-Akt(即磷酸化蛋白激酶 B)含量。**结果:**与 I/R 组及 Res + Wom 组比较,Res 组 NOS 及 NO 表达增加,显著减轻心肌细胞凋亡,Bcl-2 蛋白表达显著升高,Bax/Bcl-2 降低,Akt 的磷酸化水平增高,上述各项指标差异具有统计学意义($P < 0.05$),而上述变化能够被 PI3K-Akt 信号通路的特异性阻断剂渥曼青霉素所阻断,且其差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**白藜芦醇能够抑制缺血再灌注所致的心肌细胞凋亡,此过程有 PI3K-Akt 信号通路的参与。

[关键词] 白藜芦醇;心肌缺血再灌注损伤;细胞凋亡;PI3K-Akt 信号通路

白藜芦醇(resveratrol)是植物体内一种天然的二苯乙烯类多酚物质,其化学名为 3,4,5-三羟基酚,国内外研究表明,白藜芦醇可降低血小板聚集,对心血管病具有预防作用,是一种抗自由基、抗氧化剂,但其具体的作用机制尚不清楚。在心肌缺血再灌注损伤过程中,心肌损伤的发生是多因素多途径的。研究证明,阻断心肌损伤级联反应中的关键环节和抑制参与多信号途径的介质是防治心肌损伤和细胞凋亡的最有效方法,而磷脂酰肌醇-3-激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶(phosphatidylinositol-3-kinase-serine/threonine kinase, PI3K-Akt)信号通路是细胞内重要的信号转导通路,在对抗心肌缺血再灌注损伤、抑制细胞凋亡中发挥重要作用^[1]。本实验观察白藜芦醇预处理对大鼠急性心肌缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡的影响及其与 PI3K-Akt 信号通路的关系,探讨白藜芦醇保护缺血心肌的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康成年雄性 SD 大鼠 50 只,体重

220 ~ 250 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 药品、试剂及仪器 白藜芦醇购自四川维克奇生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$,批号 201004,使用前用二甲基亚砜(DMSO)溶解并以生理盐水稀释至所需浓度,目前研究证实白藜芦醇没有明显的不良反应,大鼠试验中,最大剂量给到 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 也未发现明显的不良反应,综合国内外文献,目前普遍使用的实验剂量是 $10 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,本实验采用的剂量为 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。渥曼青霉素、一氧化氮(NO)检测试剂盒、一氧化氮合酶(NOS)检测试剂盒、原位细胞凋亡检测试剂盒、免疫组化抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。动物人工呼吸机 DH-40(浙江大学实验仪器厂);RM6000 八导生理记录仪(日本光电公司)。

2 方法

2.1 分组 将 50 只 SD 雄性大鼠,随机分为对照组(SH 组)、缺血再灌注组(I/R 组)、白藜芦醇预处理组(Res 组)、白藜芦醇预处理 + 渥曼青霉素组(Res + Wom 组)、缺血再灌注 + 渥曼青霉素组(I/R + Wom 组),每组 10 只。

2.2 模型制备 SD 健康大鼠术前禁食 6 h,在 $1.55 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乌拉坦 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 静脉麻醉,仰卧位固定大鼠,标准 II 导联心电图监测,连接气管插管待

[稿件编号] 20110803014

[通信作者] * 刘新伟,教授,硕士生导师,主任医师,主要从事老年麻醉和体外循环心肌保护研究, Tel:13752889968

[作者简介] 何东伟,硕士研究生,主要从事心肌缺血再灌注损伤和心肌保护研究, E-mail:603155458@qq.com



开胸后连接人工呼吸机(潮气量 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 频率 $50 \text{ 次}/\text{min}$)。在胸骨左缘 0.5 cm 处纵行切开第 3 ~ 5 肋, 剪开心包, 暴露心脏, 结扎冠状动脉左前降支, 同时将一根直径 2 mm 塑料管置于结扎线和冠状动脉之间, 拉近结扎线使塑料管压迫引起冠脉闭塞, 造成急性心肌缺血模型, 观察心电图, 以出现 QRS 波群高达增宽为结扎成功的标志。缺血 45 min 后, 取出塑料管即再灌注, 以 QRS 波群振幅逐渐回落为再灌注成功标志, 进行再灌注 120 min , 假手术组的动物手术全过程与其他组相同, 但只穿线不结扎冠脉^[2]。

2.3 给药方法 假手术组: 冠状动脉左前降支只穿线, 不结扎, 穿线时由舌静脉注入生理盐水 1 mL 。缺血再灌注组: 结扎左冠状动脉前降支 45 min , 造成急性心肌缺血模型, 再灌注 120 min , 结扎前 1 min 由舌静脉注入生理盐水 1 mL 。白藜芦醇预处理组: 结扎前 1 min 由舌静脉注入白藜芦醇 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 即 1 mL 所配溶液。渥曼青霉素加白藜芦醇预处理组: 结扎前 1 min 由舌静脉注入白藜芦醇 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 即 1 mL 所配溶液及渥曼青霉素。渥曼青霉素加缺血再灌注组: 结扎前 1 min 由舌静脉注入 1 mL 生理盐水及渥曼青霉素; 各组除所加药物不同外其余处理同假手术组。

2.4 心肌组织 NOS, NO 含量的测定 一氧化氮合酶(NOS)测定采用催化 L-Arg 比色法; NO 采用硝酸酶还原法测定。

2.5 心肌凋亡细胞原位检测 再灌注结束, 迅速剪下心脏, 置于冰的 PBS 液中洗净残血, 分离左心室前壁, 于 4% 的多聚甲醛固定 12 h , 石蜡包埋。应用 TUNEL 凋亡测试试剂盒, 严格按照原位细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作。主要流程如下: 切片脱蜡脱水, 蛋白酶 K ($20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 消化 15 min , 1% 过氧化氢/甲醇溶液封闭内源性过氧化酶 (POD) 5 min , 加 $20 \mu\text{L}$ TdT 盒带地高新的标记液, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h , 加 POD 转换液, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min , 二氨基联苯胺 (DAB) 显色、苏木精复染、水洗、封片、镜检。上述步骤不加 TdT 为阴性对照。光镜下正常心肌细胞核呈蓝色, 凋亡细胞核为深浅不一的棕褐色, 每张切片于缺血部位随机选取 8 个高倍视野 ($\times 400$ 倍), 分别记数凋亡心肌细胞数和心肌细胞总数并进行汇总, 以凋亡心肌细胞数占心肌细胞总数的百分比作为凋亡指数 (apoptotic index, AI)。

2.6 心肌组织 Bcl-2, Bax 蛋白表达的免疫组化测定 每一标本取 2 个不同部位的切片各 2 张, 采用链酶亲和素-生物素-酶复合物 (strept avidin-biotin complex, SABC) 免疫组化检测 Bcl-2, Bax 蛋白的表达。主要流程如下: 切片脱蜡入水, 1% 过氧化氢封闭 POD 10 min , 加山羊血清封闭, 加 Bcl-2, Bax 蛋白的抗体, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, 滴加小鼠抗地高辛, 再滴加生物素化抗小鼠 IgG, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min , 加 SABC, 用 DAB 显色、苏木素复染、水洗、封片、镜检。阴性对照不加抗体, 阳性对照用已知阳性片, 阳性判断标准: 以细胞浆着棕黄色为阳性, 用计算机图像处理系统, 每次随机选 10 个视野, 测定细胞阳性染色的 A 与阳性细胞百分比, 计算蛋白阳性表达指数 (positive expression index, PEI), $\text{PEI} = A \times \text{阳性细胞百分比} \times 100$, 并计算 Bax 和 Bcl-2 的比值。

2.7 Western blot 测定 Akt 及 p-Akt 的蛋白表达 左心室心肌的缺血区, 置于液氮中冻存后转至 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 存放。称取冻存心肌样品 0.1 mg , 冰浴, 加入 $500 \mu\text{L}$ 组织裂解液, 冰浴匀浆, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 收集上清 $50 \mu\text{L}$ 应用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。余下上清加入 $4 \times \text{loading buffer}$, 封闭后 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 10 min , $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。以每个样品的总蛋白为 $20 \mu\text{g}$ 上样, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳 (浓缩胶为 5%, 分离胶为 12%, $120 \text{ V}/140 \text{ V}$), BioRad 干转仪 ($\leq 90 \text{ mA}$) 转膜至 PVDF, 2% 脱脂奶粉封 1 h , 一抗体封闭 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。PBST (PBS + 聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯即吐温-20, $1/1\ 000$) 洗膜 $15 \text{ min} \times 3$ 次; 二抗 ($1:4\ 000$) $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h (羊抗兔), PBST 漂洗后用增强化学发光法检测蛋白表达, 凝胶成像系统成像, 应用 UVP 凝胶图像处理系统 Labwork 4.6 软件分析目的条带的灰度值。

2.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组心肌组织中的 NOS, NO 的含量 与 I/R 组比较, Res 组 NO 和 NOS 的含量明显增加 ($P < 0.05$); Res + Wom 组和 I/R + Wom 组差异无统计学意义; 与 Res 组比较 Res + Wom 组和 I/R + Wom 组 NO, NOS 的含量明显降低 ($P < 0.05$), 见表 1。



表 1 各组 NOS, NO 的表达量的比较

Table 1 The comparisons of NOS and NO in expression in each group

分组	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	NOS/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
SH	36.60 \pm 3.42	21.18 \pm 2.75
I/R	18.38 \pm 3.90	11.35 \pm 2.00
Res	51.49 \pm 5.32 ¹⁾	30.95 \pm 3.03 ¹⁾
Res + Wom	20.52 \pm 4.10 ²⁾	12.64 \pm 2.45 ²⁾
I/R + Wom	15.29 \pm 2.89 ²⁾	10.32 \pm 1.98 ²⁾

注:与 I/R 组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 Res 组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

3.2 各组大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响

用 TUNEL 法染色的阳性的心肌细胞具有形态变圆或不规则、与周围组织脱离、核固缩、染色质浓聚等典型的凋亡细胞的形态特征,主要位于心肌梗死区与非梗死区交界处,而在心肌梗死区和非梗死区内仅见极少数散在凋亡细胞。与 I/R 组相比,Res 组 AI 显著降低 ($P < 0.05$);阻断剂渥曼青霉素组与 Res 组相比,AI 显著升高 ($P < 0.05$),阻断剂渥曼青霉素组与 I/R 相比 AI 无显著差别。

3.3 各组心肌组织中 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响

Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的部位与凋亡细胞十分相似。与 I/R 组相比,Res 组 Bcl-2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$),Bax/Bcl-2 低于 I/R 组 ($P < 0.05$),加入 PI3K-Akt 信号通路的特异性阻断剂渥曼青霉素后,与 Res 组相比,Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$),Bax/Bcl-2 高于 Res 组。Res + Wom 组与 I/R 组及 Wom 组相比,Bcl-2 蛋白的表达无显著差异,Bax/Bcl-2 无显著性差异,见表 2。

表 2 各组 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的差异比较

Table 2 The comparisons of Bcl-2 and Bax in expression in each group

组别	Bcl-2/%	Bax/%	Bax/Bcl-2
SH	14.1 \pm 1.8	15.4 \pm 3.1	1.5 \pm 0.5
I/R	6.4 \pm 1.3 ²⁾	14.7 \pm 2.5 ²⁾	2.2 \pm 0.7 ²⁾
Res	19.6 \pm 2.0 ^{1,2)}	13.5 \pm 2.7 ^{1,2)}	0.6 \pm 0.1 ^{1,2)}
Res + Wom	6.2 \pm 0.9 ^{2,3)}	13.6 \pm 2.6 ^{2,3)}	2.1 \pm 0.5 ^{2,3)}
I/R + Wom	13.9 \pm 1.8 ^{2,3)}	15.2 \pm 2.8 ^{2,3)}	1.5 \pm 0.4 ^{2,3)}

注:与 I/R 组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 SH 组比较²⁾ $P < 0.05$;与 Res 组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 各组总 Akt 及 p-Akt 的表达量 各组总 Akt 差异无统计学意义;与 I/R 组比较,Res 组 p-Akt 蛋白

表达明显增加 ($P < 0.05$);与 Res 组比较,Res + Wom 组和 I/R + Wom 组 p-Akt 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$),见表 3。

表 3 各组大鼠 T-Akt 及 p-Akt 蛋白的相对表达量比较

Table 3 The comparisons of T-Akt and p-Akt in expression in each group

组别	T-Akt	p-Akt
I/R	3.8 \pm 1.8	0.82 \pm 0.32
Res	3.7 \pm 2.2 ¹⁾	1.98 \pm 0.43 ¹⁾
Res + Wom	3.9 \pm 2.1 ²⁾	0.62 \pm 0.22 ²⁾
I/R + Wom	4.2 \pm 1.9 ²⁾	0.41 \pm 0.18 ²⁾

4 讨论

Maroko^[3]等研究发现,细胞凋亡是心肌缺血时心肌损伤的主要形式,心肌细胞的凋亡程度决定了心肌梗死面积的大小。最初的研究大多从被动途径探讨心肌保护的机制,比如通过减少中性粒细胞的聚集、改善冠状动脉内皮功能、减少活性氧的产生及降低线粒体钙离子浓度等。后来的研究表明,在致死性缺血再灌注之初,各种心肌保护手段能够主动募集信号转导通路,特别是磷脂酰肌醇-3-激酶-丝氨酸/苏氨酸激酶(PI3K-Akt)信号通路。目前认为,主动效应在心肌保护作用中可能占据着更重要的位置^[1]。

白藜芦醇的心血管保护作用机制涉及抑制血小板聚集组织因子的表达^[4]、促进血管舒张、抑制脂质过氧化^[5]、抑制血管平滑肌细胞增殖^[6]等。渥曼青霉素是 PI3K-Akt 信号通路的特异性阻断剂。实验过程观察到预先给予白藜芦醇后凋亡的心肌细胞数量明显减少,但是应用 PI3K-Akt 信号通路的特异性阻断剂后,细胞凋亡数量明显增加 ($P < 0.05$)。NO 的信号内转导途径可以与细胞凋亡的信号传递通路相互联系,抑制 caspase-3 裂解为 Bcl-2,从而减少细胞凋亡^[7]。Bcl-2 家族是主要的凋亡调控蛋白,Bcl-2 蛋白具有促进细胞生存,抑制细胞凋亡的作用,而 Bax 蛋白促进细胞凋亡,其中 Bax 与 Bcl-2 的表达比例是决定细胞是否凋亡的关键。心肌缺血再灌注损伤发生后,心肌细胞 Bcl-2 蛋白表达下降。本实验发现,白藜芦醇预处理后,心肌组织中 Bcl-2 蛋白表达上调,Bax 蛋白表达下调,Bax/Bcl-2 下调,心肌细胞凋亡的数量显著下降,而同时应用白藜芦醇和渥曼青霉素时,白藜芦醇的上述作用显著减弱,这一结果提示白藜芦醇减少心肌细胞凋亡的机制可



能是通过上调 Bcl-2 蛋白的表达,下调 Bax/Bcl-2 来实现的,且有 PI3K-Akt 信号通路的参与,此外,NO 还可以通过影响缺血再灌注过程中的炎症反应过程,减少心肌细胞坏死和凋亡^[8]。白藜芦醇预处理后,心肌组织中的 NOS 活性和 NO 含量上升,心肌细胞凋亡的数量显著下降。研究证实,部分心肌保护的作用机制最终依赖于 Akt 的活化^[9], PI3K-Akt 保护心脏的机制中涉及到多种细胞内信号转到介质和效应蛋白。活化的 Akt 能作用于它下游的多个靶点,并可能最终通过减少线粒体通透性转换孔(mPTP)的开放,来改善线粒体能量的生成,保持线粒体外膜的稳定性,减少促凋亡因子的活化等,发挥保护心肌功能,抗凋亡的作用。Western 结果显示 Akt 的活化水平有显著的差异($P < 0.05$)。

由此提示白藜芦醇对心肌缺血再灌注引起的细胞凋亡具有抑制效应,而这种保护作用能被渥曼青霉素所阻断,这种抑制可能与激活 PI3K-Akt 信号通路有关,而激活后的 Akt 具体是如何发挥保护效应,还需进一步研究。

[参考文献]

[1] Matsui T, Rosenzweig A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function; the role of PI3K-Akt

- [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 38(1):63.
- [2] 廖奕华, 邓云海, 邓静修, 等. 黄芪注射液对家兔急性心肌梗死再灌注损伤的保护作用[J]. *辽宁中医学院学报*, 2002(3):55.
- [3] Maroko P R, Kjekshus J K, Sobel B E, et al. Factors influencing in-farct size following experimental coronary artery occlusions[J]. *Circulation*, 1971, 43(1):67.
- [4] Pendurthi U R, Rao L V. Resveratrol suppresses agonist induced monocyte adhesion to cultured human endothelial cells [J]. *Thromb Res*, 2002, 106:243.
- [5] Hung L M, Chen J K, Huang S S, et al. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 47:549.
- [6] Haider U G, Roos T U, Kontaridis M I, et al. Resveratrol inhibits angiotensin II and EGF-mediated Akt activation; role of Gab1 and Shp2[J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(1):41.
- [7] 马世玉, 吴基良, 向继洲, 等. 倒卵叶五加总皂苷对大鼠心肌梗死再灌注损伤后 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响[J]. *华中科技大学学报*, 2003, 32(2):145.
- [8] 张峰, 罗晓星, 张涛, 等. 缺氧复氧诱导的心肌细胞凋亡及一氧化氮对此过程的作用[J]. *中国药理学通报*, 2002, 18(3):288.
- [9] Tong H, Chen W, Steenbergen C, et al. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C[J]. *Circ Res*, 2000, 87(4):309.

Inhibitory effect of resveratrol on ischemia reperfusion-induced cardiocyte apoptosis and its relationship with PI3K-Akt signaling pathway

HE Dongwei, LIU Xinwei*, PANG Yong, LIU Liu

(Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of resveratrol on ischemia reperfusion-induced cardiocyte apoptosis and its relationship with PI3K-Akt signaling pathway. **Method:** Fifty male SD rats were divided randomly into five groups: the control group (SH group), the ischemia reperfusion group (I/R group), the resveratrol pretreatment group (Res group), the resveratrol pretreatment + wortmannin group (Res + Wom group) and the ischemia reperfusion + wortmannin group (I/R + Wom group). The myocardial ischemia model was established by ligating left coronary artery for 45 min followed by 120 min reperfusion, in order to observe the contents of NOS and NO. Cardiac myocyte apoptosis was determined by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). Bcl-2 and Bax proteins were detected by immunohistochemistry. The t-Akt and p-Akt signaling protein expressions were determined by Western blotting analysis. **Result:** Compared with the I/R groups and the Res + Wom group, the Res group showed significant increase in the expressions of NOS, NO, Bcl-2 protein and p-Akt and notable decrease in cardiocyte apoptosis and Bax/Bcl-2. The difference of above indicators showed a statistical significance ($P < 0.05$). Furthermore, above changes can be blocked by wortmannin, a specific blocker of PI3K-Akt signaling pathway, indicating a statistical significance in their changes ($P < 0.05$). **Conclusion:** Resveratrol can inhibit the ischemia reperfusion-induced cardiocyte apoptosis, in which PI3K-Akt signaling pathway gets involved.

[Key words] resveratrol; cardiocyte ischemia-reperfusion injury; apoptosis; PI3K-Akt

doi:10.4268/cjcm20121529

[责任编辑 张宁宁]