

缺血后处理对猪非梗死区心肌细胞凋亡的影响

孙海梅¹⁾, 郭涛²⁾, 王雨平¹⁾, 王家平³⁾, 申丽娟⁴⁾

(1) 昆明医科大学第一附属医院 ICU; 2) 心内科, 云南昆明 650032; 3) 昆明医科大学第二附属医院放射科, 云南昆明 650101; 4) 昆明医科大学病理教研室, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 探讨缺血后处理对猪非梗死区心肌细胞凋亡的影响. **方法** 滇南小耳猪 15 只, 随机分为 3 组. (1) 假手术组 (S 组, n=5), 未行冠脉封堵及心肌缺血; (2) 缺血再灌注组 (I/R 组, n=5), 心肌缺血 60 min 后, 不行缺血后处理, 直接撤除球囊; (3) 缺血后处理组 (Postcond 组, n=5), 心肌缺血 60 min 后, 通过球囊充气和放气造成 8 次 30 s/30 s 短暂缺血再灌注. 再灌注 72 h 采用 2, 3, 5 氯化三苯基氯四氮唑 (TTC) 染色确定心肌梗死面积; 在猪非心肌梗死区, 采用 TUNEL 法检测心肌凋亡细胞及免疫组化检测 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达. **结果** 再灌注 72 h, 缺血后处理组心肌梗塞面积、非心肌梗死区细胞凋亡指数及 Bax 的蛋白表达和 Bax/Bcl-2 的比值明显低于再灌注组 ($P < 0.05$). **结论** 缺血后处理可能通过减轻非梗死区心肌细胞凋亡发挥心肌保护作用.

[关键词] 缺血后处理; 心肌梗死; 细胞凋亡

[中图分类号] R542.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 10-0014-05

Effects of Ischemic Postconditioning on Myocardial Apoptosis in Non-infarct Zone in Pigs with Myocardium

SUN Hai - mei¹⁾, GUO Tao²⁾, WANG Yu - ping¹⁾, WANG Jia - ping³⁾, SHEN Li - juan⁴⁾

(1) Dept. of ICU; 2) Dept. of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunna 650032; 3) Dept. of Radiology, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650030; 4) Dept. of Pathology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of ischemic postconditioning on myocardial apoptosis in non-infarct zone in pigs with myocardium. **Methods** Fifteen Diannan small-ear pigs were divided into three groups (n=5 pre group) randomly: (1) Sham-operated (S) group: A balloon catheter was positioned in the mid-distal left anterior descending (LAD) via right femoral artery under fluoroscopic guidance, without ischemia; (2) Ischemia-reperfusion (I/R) group: the balloon was inflated and occluded the LAD for 60 minutes; (3) ischemic postconditioning (Postcond) group: pigs were treated the same as I/R group and 8 cycles of 30 s R and 30 s I before reperfusion. After 72 h of reperfusion, infarction size were measured by 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. The apoptotic cells in the non-infarct zone myocardium was determined with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-fluorescence in nick end (TUNEL) method, and apoptosis-related molecules were studied by immunohistochemical analysis. **Result** After 72h of reperfusion, the infarction size, apoptotic index (AI) of non-infarcted zone, the levels of Bax protein expression, and Bax/Bcl-2 ratio were significantly lower in Postcond group than those in I/R group ($P < 0.05$). **Conclusion** Ischemic postconditioning can reduce myocardial apoptosis in non-infarct zone and maybe play a myocardial protection effect.

[Key words] Ischemic postconditioning; Myocardial infarction; Apoptosis

[基金项目] 云南省应用基础研究基金资助项目 (2007C243M)

[作者简介] 孙海梅 (1972~), 女, 白族, 云南大理市人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事危重病医学临床工作.

缺血后处理是近年来 Zhao 等提出的一种新的心肌保护措施^[1]。近来研究显示缺血后处理可降低心肌梗死范围及心肌酶释放, 但对心肌细胞凋亡是否有影响报道较少, 尚未见到对非梗死区心肌细胞凋亡评价的报道^[2-4]。本课题属系列研究, 在建立猪闭胸式心肌梗死模型的基础上, 通过观察缺血后处理对猪的心肌缺血再灌注损伤后心梗面积和非梗死区心肌细胞凋亡的影响, 探讨缺血后处理对猪的心肌保护作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

2, 3, 5 氯化三苯基氯四氮唑 (TTC) 购自 Sigma 公司。原位细胞凋亡检测 (TUNEL) 试剂盒及 NBT 显色剂、蛋白酶 K、胃蛋白酶等均购自福州迈新生物技术有限公司。免疫组织化学主要试剂: Bcl-2 单克隆抗体, Bax 单克隆抗体, 浓缩型组织抗原修复液, 液体 DAB 酶底物显色试剂盒, PBS 粉剂, 多聚-L-赖氨酸均购自福州迈新生物技术有限公司。HPIAS-1000 高清晰病理图文分析系统 (同济医科大学千屏影像工程公司产品), 戊巴比妥钠购自杭州赛诺菲公司。青霉素购自山东鲁抗药业。实验中导丝 (长、短导丝及球囊导丝), 动脉鞘、穿刺针、导管及压力泵等均为德国贝朗公司产品, 均为临床使用过的废旧材料, 并在术前 12 h 用 2% 戊二醛消毒液浸泡消毒。数字减影血管造影机 (飞利浦公司, FD10 机型)。心电监护仪 (美国公司, Dash3000 机型)。

1.2 实验动物及分组

15 只 8 ~ 11 月健康滇南小耳猪, 雌雄不拘, 体质量 19 ~ 24.5 kg, 由昆明医科大学实验动物学部。实验动物随机分为 3 组: 假手术组 (S 组, n = 5), 缺血再灌注组 (I/R 组, n = 5), 缺血后处理组 (Postcond 组, n = 5)。

1.3 猪闭胸式心肌缺血再灌注模型的制备

实验猪, 空腹 6 h 以上, 3% 戊巴比妥钠 20 ~ 30 mg/kg 耳缘静脉麻醉后将猪仰卧固定在手术台上施行手术。监测心电及血压, 据肢体运动情况每 20 ~ 30 min 重复静脉注射戊巴比妥钠 2 ~ 5 mg/kg, 使猪保持麻醉状态。行右股动脉穿刺, 置入 6 F 动脉鞘, 静脉注入肝素 8 000 U, 后每隔 1 h 追加注射肝素 2 000 U。经动脉鞘置入 5F 猪尾导管至左心室, 行左心室造影。以 5F 3.0 L 左冠状动脉造影导管分别行左、右冠状动脉造影, 观察猪冠状动脉的分布情况。在导丝指引下, 置入 2.0 mm 或 2.5

mm 的球囊至左前降支 (LAD) 第一对角支的远端, 以 3 ~ 4 atm 打开球囊堵闭 LAD。心肌梗死模型成功标志: 冠脉造影显示球囊远端血流中断, 心电图表现为 V1 ~ V3 导联出现 ST 段抬高, T 波高耸融合。撤除球囊形成再灌注, 拔除动脉鞘管并压迫止血。假手术组不行球囊充气堵闭冠脉; 缺血再灌注组行球囊充气堵闭 LAD 60 min 后直接撤除球囊; 缺血后处理组行球囊充气堵闭 LAD 60 min 后, 球囊放气 30 s, 充气 30 s (循环 8 次)。实验结束后肌注青霉素 400 万 U, 在猪清醒之前送回动物中心。手术后约 1 h 猪苏醒, 第 2 天即可进食。

1.4 心肌梗死范围测定

心肌缺血再灌注 72 h 后, 将实验猪用 3% 戊巴比妥钠静脉麻醉后, 仰卧固定在手术台上, 开胸取心脏, 生理盐水冲洗心脏后, 沿心脏的基底部短轴方向将左心室连续切成 4 ~ 5 mm 的薄片, 对心肌行 2, 3, 5 氯化三苯基氯四氮唑 (TTC) 染色, 将心肌放入含有 10 g/L TTC 的 PBS (pH = 7.4) 溶液中孵育 10 min。根据染色与否定义其梗死灶。TTC 染色区 (深红色) 示仍存活的心肌组织, 非 TTC 染色区 (灰白色) 即梗死区。扫描后用图像分析软件计算心肌梗死体积和左室体积, 用梗死体积占左室体积的百分比表示并计算心肌梗死面积。

1.5 原位末端标记技术 (TUNEL) 检测心肌凋亡细胞

取非梗死区组织, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋组织切片, 行末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUPT 缺口末端标记法 (TUNEL 法) 和免疫组织化学法检测。

应用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUPT 缺口末端标记法 (TUNEL 法), 严格按照试剂盒说明书进行操作。TUNEL 检测细胞凋亡的阳性信号为棕色颗粒, 定位于细胞核, 阳性细胞在组织中的分布不一, 染为蓝色的细胞核未发生凋亡。随机选取 5 张切片, 应用 HPIAS-1000 高清晰病理图文分析系统在 10 × 40 倍镜下随机取 5 个视野, 计数每个视野中的阳性细胞数以及总细胞数, 据文献^[5]报道计算心肌细胞凋亡指数 (apoptotic index, AI) 进行定量分析, 以此反应凋亡程度。

$$AI = \frac{\text{阳性细胞数}}{\text{总细胞数}} \times 100\%$$

以 5 个视野的均值代表每个区域的细胞凋亡指数。

1.6 免疫组织化学法检测 Bax 和 Bcl-2 的蛋白表达

采用免疫组化 S-P 法 (链霉菌抗生物素蛋白

一过氧化酶连接法)。用 PBS 代替一抗作阴性对照, 每例均以 HE 染色切片作对照观察, 严格按照说明书操作。

在光学显微镜下 Bax 和 Bcl-2 主要呈胞浆分布, 其阳性细胞呈棕黄或棕褐色。本研究据文献报道^[6]采用阳性单位 (positive unit, PU) 用于定量表达猪心肌组织 Bcl-2 和 Bax 的蛋白免疫组织化学阳性反应的程度。PU 值的大小与阳性反应程度成正比。在梗死区、边缘区和非梗死区分别随机选取 5 张切片, 应用 HPIAS-1000 高清晰病理图文分析系统测定 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的 PU 值。以 5 个视野 PU 的均值代表每个区域 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 统计软件进行分析。计量资料以

($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间不同时间点均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌梗死范围

术后 72 h 行 TTC 染色, 存活心肌组织被红染, 而未被染色的区域呈白色或灰白色为梗死区。经图像分析处理后, 假手术组未发生心肌梗死, 后处理组心肌梗塞的面积是 (10.89 ± 2.02)%, 再灌注组心肌梗塞的面积 (23.26 ± 3.13)%, 两者差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示缺血后处理组的心梗范围明显低于再灌注组, 见图 1, 表 1。

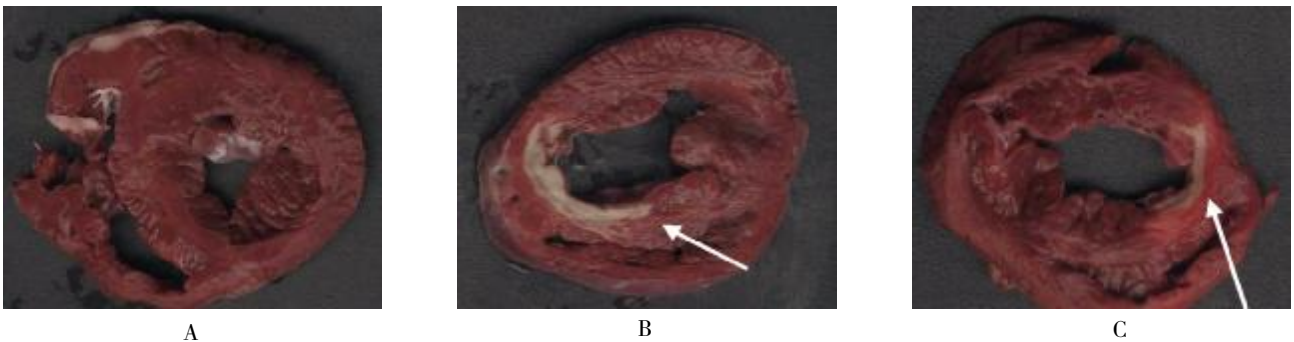


图 1 3 组心肌梗死范围

Tab. 1 The myocardial infarct size in three groups

A:假手术组; B:缺血再灌注组; C:缺血后处理组.

表 1 3 组心肌梗范围 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The myocardial infarct size in three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	心梗面积 (%)
S 组		-
I/R 组	5	23.26 ± 3.13
Postcond 组	5	$10.89 \pm 2.02^*$

与 I/R 组相比, $*P < 0.05$.

2.2 TUNEL 法原位检测非梗死区猪心肌细胞凋亡

TUNEL 检测细胞凋亡的阳性信号为棕色颗粒, 定位于细胞核。假手术组未发现凋亡阳性细胞 (见图 2), 非梗死区缺血再灌注组凋亡阳性细胞明显低于再灌注组 (见图 3, 4、表 2)。

2.3 免疫组织化学法检测非梗死区心肌组织 Bax 与 Bcl-2 的蛋白表达

免疫组织化学法结果显示, 假手术组猪 Bcl-2

及 Bax 蛋白有一定量的表达, 再灌注组 Bcl-2 及 Bax 蛋白均较假手术组明显增高 ($P < 0.05$), 后处理组 Bax 的蛋白表达和 Bax/Bcl-2 的比值均明显低于再灌注组 ($P < 0.05$), 见表 3。

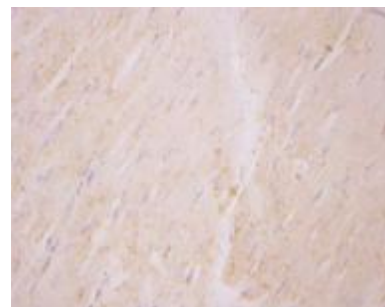


图 2 假手术组未发现凋亡阳性细胞 TUNEL 法 ($\times 400$)
Fig. 2 Apoptotic myocytes were not found by TUNEL staining in the sham operation group ($\times 400$)

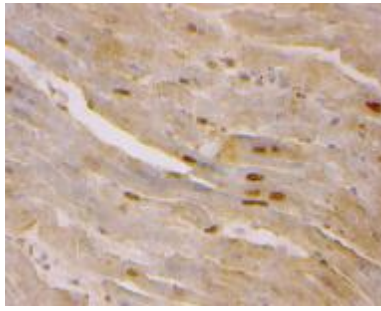


图 3 缺血再灌注组心肌非梗死区的凋亡细胞 TUNEL 法 ($\times 400$)

Fig. 3 Apoptotic myocytes were found by TUNEL staining in ischemia-reperfusion group ($\times 400$)

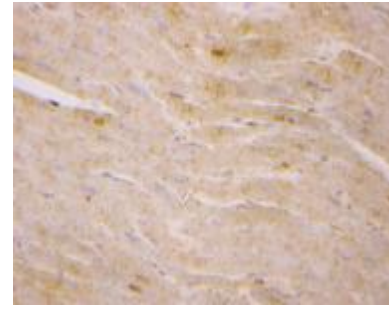


图 4 缺血后处理组心肌非梗死区的凋亡细胞 TUNEL 法 ($\times 400$)

Fig. 4 Apoptotic myocytes were found by TUNEL staining in ischemic postconditioning group ($\times 400$)

表 2 TUNEL 法原位检测非梗死区心肌细胞凋亡指数 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Detection of myocyte apoptosis index in the non-infarct zone by TUNEL staining ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	非梗死区 (%)
S 组		-
I/R 组	5	10.29 \pm 2.25
Postcond 组	5	4.97 \pm 1.48*

与 I/R 组相比较, * $P < 0.05$.

表 3 免疫组织化学法检测非梗死区 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Bcl-2 and Bax expression in the non-infarct zone by immunohistochemical analysis ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	Bax (PU)	Bcl-2 (PU)	Bax/Bcl-2 (PU)
S 组	5	5.66 \pm 1.74	14.35 \pm 4.27	0.40 \pm 0.07
I/R 组	5	16.29 \pm 4.52 [#]	24.19 \pm 4.93 [#]	0.67 \pm 0.08 [#]
Postcond 组	5	10.92 \pm 3.44*	25.31 \pm 4.29 [#]	0.42 \pm 0.08*

与 S 组相比较, * $P < 0.05$; 与 I/R 组相比较, * $P < 0.05$

3 讨论

缺血后处理是近年来提出的启动机体内源性的保护措施^[1,4]。近来研究表明, 缺血后处理对鼠、兔、犬等体型较小的动物心肌保护效果较为肯定, 但对体型较大且冠脉与人类最为接近的猪的心肌保护作用却尚无定论, 研究缺血后处理对猪是否有心肌保护作用对其进一步临床应用具有重要意义^[6-9]。目前缺血后处理具体的心肌保护作用机制尚不清楚^[3,9-12]。研究显示缺血后处理可降低心肌梗死范围及心肌酶释放, 但对心肌细胞凋亡是否有影响报道较少。对动物及人类心肌的研究提示, 随着再灌注时间的延长, 细胞凋亡逐渐增加, 心肌梗死面积进一步扩大, 心功能受损加重^[13-15]。在心肌梗死区、梗死边缘区、非梗死区的心肌组织均存在细胞凋亡现象^[4,13,16]。目前尚未见到缺血后处理对非梗死区心肌细胞凋亡评价的报道^[2-4]。

本研究采用球囊封堵冠脉建立猪闭胸式心肌缺血再灌注损伤动物模型^[17], 探讨缺血后处理对猪心肌梗面积和非梗死区心肌细胞凋亡的影响。再灌注 72 h, 对心脏进行 TTC 染色, 结果显示缺血后处理组的心梗面积为 (10.89 \pm 2.02) %, 再灌注组为 (23.26 \pm 3.13) %, 提示后处理组心梗面积较再灌注组明显降低 ($P < 0.05$)。TUNEL 法检测猪非心肌梗死区的凋亡细胞, 结果显示缺血后处理组能明显降低猪非梗死区心肌细胞凋亡。免疫组织化学法检测与凋亡密切相关的 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达显示, 后处理组的非心肌梗死区 Bax 蛋白表达和 Bax/Bcl-2 的比值均较再灌注组明显降低。

本研究初步证实缺血后处理可能通过减轻非梗死区心肌细胞凋亡发挥心肌保护作用。对心肌再灌注损伤的机制及治疗进行了有益的探索, 但能否应用于临床尚有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] ZHAO Z-Q, CORVERA J S, HALKOS M E, 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): 579 - 588.
- [2] CRISOSTOMO P R, GEORGE M W, MEIJING W, et al. p-reconditioning versus postconditioning: mechanisms and therapeutic potentials[J]. *J Am Coll Surg*, 2006, 202(5): 797 - 812.
- [3] 孙海梅, 郭涛. 缺血后处理心肌保护作用的基础与临床研究[J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(6): 1111 - 1113.
- [4] HAIMEI SUN, TAO GUO, LIU LIU, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after acute myocardial infarction in pigs[J]. *Heart Surgery Forum*, 2010, 13(5): 305 - 310.
- [5] ZHANG H F, FAN Q, QIAN X X, et al. Role of insulin in the anti-apoptotic effect of glucose-insulin-potassium in rabbits with acute myocardial ischemia and reperfusion[J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6): 777 - 783.
- [6] 黄泽萍, 郭健莲, 陶金华. 免疫组织化学的阳性单位定量在生物医学中的应用[J]. *生物医学体视学和军事病理学—理论与实践*, 2005, 10: 60 - 62.
- [7] ILIODROMITIS E K, GEORGIADIS M, COHEN M V, et al. Protection from postconditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs[J]. *Basic Res Cardiol*, 2006, 101(6): 502 - 507.
- [8] SCHWARTZ L M, LAGRANHA C J. Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs[J]. *Am Physiol*, 2006, 290(3): 1011 - 1018.
- [9] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 缺血后处理抗猪心肌梗死致心律失常的作用研究[J]. *昆明医学院学报*, 2009, 30(2): 12 - 16.
- [10] ZHAO Z Q, VINTEN-JOHANSEN J. Postconditioning: Reduction of reperfusion-induced injury[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70(2): 200 - 211.
- [11] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 缺血后处理对缩小猪急性心肌梗死面积的作用观察[J]. *重庆医学*, 2010, 39(5): 522 - 523.
- [12] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 缺血后处理对猪心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26(3): 384 - 386.
- [13] ZHAO Z Q, VELEZ D A, WANG N P, et al. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion[J]. *Apoptosis*, 2001, 6(4): 279 - 290.
- [14] RODRIGUEZ M, LUCCHESI BR, SCHAPER J. Apoptosis in myocardial infarction [J]. *Ann Med*, 2002, 34: 470 - 479.
- [15] ABBATE A, BIONDI-ZOCCAI GG, BALDI A. Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling [J]. *J Cell Physiol*, 2002, 193: 145 - 153.
- [16] TAKEMURA G, FUJIWARA H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction [J]. *Pharmacol Ther*, 2004, 104(11): 1 - 16.
- [17] 孙海梅, 郭涛, 喻卓, 等. 以球囊封堵法建立猪心肌梗死模型的可行性研究[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(46): 9032 - 9036.
(2012-06-23 收稿)