

· 研究报告 ·

外周型苯二氮草受体在缺氧/复氧损伤大鼠心肌细胞凋亡中的作用

刁玉刚 祖剑宇 刘海梅 刘洁 马虹 王俊科

【关键词】 外周型苯二氮草受体； 缺氧/复氧损伤； 凋亡； 心肌细胞

外周型苯二氮草受体(PBR)是一种由 169 个氨基酸组成的线粒体外膜蛋白,是线粒体通透性转换孔(PTP)的重要组成部分^[1]。PBR 基因敲除鼠在发育早期死亡,提示 PBR 在细胞中扮演了极重要的作用^[2]。有关 PBR 抗缺血性保护作用正成为国内外的研究热点,本研究以此作为重点,报告如下。

1 材料与与方法

1.1 动物和试剂:2~4 日龄的 Wister 大鼠,雌雄不拘,由中国医科大学实验动物中心提供。氨基酰异喹啉类衍生物 1-(2-氯芬)-N-甲基-N-(1-甲丙基)-3-异喹啉-氨基甲酰(PK11195, Alexis, 美国),苯二氮草类衍生物 Ro5-4864 (Biomol, 美国),胰蛋白酶、胶原酶 (Amresco, 美国),Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM, Gibco, 美国),胎牛血清(天津灏洋生物),异硫氰酸荧光素/钙结合蛋白 V(FITC/Annexin V, 宝灵曼, 德国),碘化丙啶(PI, Sigma, 美国),一步法逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(Promega, 美国)。

1.2 心肌细胞分离培养和鉴定:采用改良的 Simpson 法^[3]分离培养大鼠心肌细胞。体积分数为 75%的乙醇消毒皮肤;无菌取出心脏,用冷 D-Hanks 液冲洗 3 次,去外膜后于冰浴中剪取心尖部分心肌,剪碎成 1 mm³ 左右糊状,加入含质量分数为 0.05%胶原酶、0.08%胰蛋白酶和 0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)的消化液 10 ml, 37℃ 100 r/min(离心

半径 6 cm)磁力搅拌消化 3 min,静置 1 min,弃上清,再加入消化液 10 ml,消化 10 min,静置 2 min。收集上清液,加入同体积的冷 DMEM 培养液(含体积分数为 10%的胎牛血清)终止消化,重复消化 3~5 次。最后全部上清液以 1 000 r/min(离心半径 20 cm)离心 7 min,所得细胞重悬于 DMEM 培养液中(含 20%胎牛血清)。全部细胞经 200 目滤网过滤,37℃ 下在体积分数为 5%的 CO₂ 细胞培养箱中预培养 2 h,利用贴壁速度的差异去除贴壁的非心肌细胞。悬浮细胞转移于 100 ml 培养瓶中,隔天换液,培养前 2 d 加入 5-溴脱氧嘧啶 0.1 mmol/L,抑制非心肌细胞贴壁生长,待细胞接近融合呈整体搏动,电子显微镜下观察心肌细胞肌节,清楚则确认心肌细胞培养成功。

1.3 大鼠心肌缺氧/复氧模型的建立:用经高纯氮气饱和 15 min 的 DMEM 培养液〔含 NaCl 118 mmol/L、NaHCO₃ 24 mmol/L、NaH₂PO₄ 1 mmol/L、CaCl₂ 2.5 mmol/L、MgCl₂ 1.2 mmol/L、乳酸钠 20 mmol/L、KCl 16 mmol/L、乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA) 0.5 mmol/L、pH7.0〕换液,置于缺氧/复氧装置中,充入高纯氮气造成缺氧,调节气体流量计使气体流速为 5 L/min,5 min 后关闭进出气阀门,放入 5%的 CO₂ 培养箱 37℃ 培养 30 min。复氧时迅速打开装置,用含 20%胎牛血清的含糖 DMEM 营养液换液后置于培养箱中正常培养 2 h,建立缺氧/复氧损伤模型。

1.4 实验分组:将培养融合的心肌细胞随机分组:C 组为空白对照组;HR 组为缺氧 30 min、复氧 2 h 模型组;P 组为使用 PBR 拮抗剂 PK11195 组;R 组为使用 PBR 激动剂 Ro5-4864 组;PR 组为联合使用 PK11195+Ro5-4864 组。P 组和 R 组均在缺氧前 30 min 向培养液中分别加入终浓度为 10⁻⁴ mol/L 的 PK11195 和 Ro5-4864;PR 组在缺氧前 30 min 加入以上浓度的两种药物共同孵育,然后再进行缺氧/复氧。

1.5 RT-PCR 检测 PBR mRNA:表达目的基因 PBR mRNA 的预扩增片段为 526 bp,上游引物为 5'-CAGAATTCA TGGCCCCGCCCTGGGTGCC-3',下游引物为 5'-ACGGATCCTCACTCTG GCAGCCGCCGTC-3';内对照 β-肌动蛋白(β-actin)预扩增片段为 700 bp,上游引物为 5'-GTGGGCCGCTCTAGGC ACCAA-3',下游引物为 5'-CTCTTT GATGTCACGCACGATTTC-3'。目的基因引物和内对照引物由上海博亚生物技术有限公司合成。按 RT-PCR 试剂盒说明加入逆转录反应体系,进行一步法 RT-PCR。用逆转录合成第一链 cDNA,反应条件为 42℃、30 min,95℃、5 min,将逆转录产物直接用于 PCR。第二链 cDNA 合成及 PCR 扩增的反应条件为 94℃变性 40 s,60℃退火 40 s,72℃延伸 60 s,30 个循环,最后 72℃、5 min,4℃保存。琼脂糖凝胶电泳后测定电泳条带密度值,以 β-actin 为内参照,计算 PBR mRNA 的相对含量,结果以 PBR 条带密度占 β-actin 条带密度的百分比表示。

1.6 流式细胞仪 Annexin V/PI 双标法检测细胞凋亡:细胞模型成功后收集悬浮细胞,荧光溶液 FITC/Annexin V 和 PI 终浓度均为 1 mg/L。采用美国 BD 公司 FACS Calibur 流式细胞仪,激发光波长 488 nm,用一波长为 515 nm 的通带滤器检测 FITC 荧光,用另一波长 > 560 nm 的滤器检测 PI,用 CellQUEST 软件分析实验结果。

1.7 统计学处理:实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS12.0 统计软件进行单因素方差分析,方差齐性采用 LSD 检验,方差不齐采用 Dunnett T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PBR 对缺氧/复氧损伤大鼠心肌细胞凋亡的影响(表 1):HR 组心肌细胞凋亡率较 C 组明显增加($P < 0.01$);R 组心肌细胞凋亡率较 HR 组明显下降($P < 0.05$),而 P 组和 PR 组与 HR 组比

基金项目:辽宁省教育厅高等学校科学技术研究基金项目(2004D181)

作者单位:110001 辽宁沈阳,中国医科大学附属第一医院麻醉科(刁玉刚,刘海梅,马虹,王俊科);110003 中国医科大学附属第二医院麻醉科(祖剑宇);110001 中国医科大学实验技术中心(刘洁)

作者简介:刁玉刚(1972-),男(汉族),辽宁省人,医学博士,主治医师(现在解放军沈阳军区总医院麻醉科工作,Email:diaoy72@msn.com)。

较差异无统计学意义(P 均 >0.05)。

2.2 缺氧/复氧损伤中心肌细胞 PBR mRNA 表达的变化(表 1):HR 组心肌细胞 PBR mRNA 表达较 C 组明显降低($P<0.05$);R 组心肌细胞 PBR mRNA 表达较 HR 组明显增加($P<0.01$),而 P 组和 PR 组与 HR 组比较差异无统计学意义(P 均 >0.05)。

表 1 各组缺氧/复氧损伤大鼠心肌细胞凋亡及 PBR mRNA 表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	细胞凋亡率(%)	PBR mRNA 含量(%)
C 组	7	2.51±0.67	28.52±7.04
HR 组	7	26.58±2.70*	17.75±3.74*
P 组	7	29.50±3.76*	18.94±5.32*
R 组	7	9.41±0.55*△	63.17±11.05**△
PR 组	7	27.44±3.08**#	18.40±6.13*

注:与 C 组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;
与 HR 组比较,△ $P<0.05$,▽ $P<0.01$;与 R 组比较:# $P<0.01$

3 讨论

在溶栓、不稳定型心绞痛、心内直视手术、心肺移植、冠状动脉旁路移植术和心肺复苏时,心肌缺血/再灌注(I/R)损伤仍无法完全避免。1986 年,缺血预适应(IPC)现象首先被 Murry 等^[4]报道在心肌细胞中存在,并证实 IPC 对随后的 I/R 损伤具有保护作用,而线粒体对调节细胞凋亡具有重要的作用。有报道,ATP 敏感性钾通道参与了药物预适应的心肌保护作用^[5];但在细胞凋亡过程的“瀑布式”反应中,线粒体 PTP 开放导致膜通透性增高是细胞凋亡的关键步骤^[6]。

PBR 在产生类固醇的组织中表达十分广泛,其在心、肺、肝、肾及血液细胞中表达都很丰富。研究表明,PBR 的功能与电压依赖性阴离子通道(VDAC)和核苷酸腺嘌呤转位体(ANT)有关,并参与调节线粒体的 PTP 开放^[7-8]。因此,确定 PBR 及其配体在线粒体、细胞和心肌 I/R 损伤的作用成为研究热点。

I/R 损伤实质就是细胞缺氧/复氧损伤,本实验采用培养乳鼠心肌细胞缺氧、缺氧及复氧损伤模型,被认为能较好反应真实心肌的 I/R 过程,同时排除在体和离体整体心脏缺血模型中难以控制的神经、体液、激素及心肌各类细胞的相互影响。在研究中发现,PBR mRNA 表达的变化与心肌细胞缺氧/复氧损伤所致的细胞凋亡呈负相关,使其具有类似

Bcl-2 抗凋亡作用;PBR 激动剂 Ro5-4864 对细胞缺氧/复氧损伤的心肌细胞具有明确的保护作用,可以明显降低大鼠心肌细胞缺氧/复氧的细胞凋亡,其作用可以被 PBR 经典的特异性拮抗剂 PK11195 所逆转,证明这种保护作用具有 PBR 依赖性。

类似的研究也表明,PBR 作为一种抗凋亡蛋白参与了细胞凋亡的调节,PBR 的抗凋亡作用可能是通过线粒体的早期变化而起作用的,这些结果与早期观察到的 PBR 在 H_2O_2 处理的造血细胞抗凋亡过程中具有保护作用是一致的^[9]。同样的研究也显示,在人的淋巴细胞株 U937 中,以 H_2O_2 诱导氧化应激模型,结果显示 PBR 激动剂具有保护作用,表明 PBR 特异性激动剂 SSR180575 和 Ro5-4864 能防止 H_2O_2 引起的氧化磷酸化损伤,对线粒体具有保护作用,并具有剂量依赖性^[10]。还有研究证明,PBR 在 I/R 损伤后能调节肾小管细胞的坏死和凋亡,并在肾功能障碍的信号转导通路中起重要作用,表明 PBR 激动剂对鼠肾脏 I/R 损伤具有明显的保护作用^[11]。另外,在 H_2O_2 诱导损伤的心肌氧化应激模型中,PBR 激动剂可以抑制细胞色素 C 释放、天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)活化和 DNA 断裂,体外应用或预先口服 PBR 激动剂 SSR180575 可显著减小心肌 I/R 损伤引起的心肌收缩功能降低程度和心肌梗死面积,并具有剂量依赖性,表现出一定的保护作用^[12]。

综上所述,PBR 激动剂能保持线粒体完整性、减轻细胞凋亡,保护心肌,防止 I/R 损伤。这一结果阐明了再灌注后细胞凋亡是通过 PBR 受体的新机制,为预防和治疗 I/R 损伤提供可能的干预手段。但有关 PBR 对应激反应的调节通路还不完全清楚,仍需要做大量的工作及深入的研究来阐明。

参考文献:

- Anholt R R, Pedersen P L, De Souza E B, et al. The peripheral - type benzodiazepine receptor, Localization to the mitochondrial outer membrane [J]. J Biol Chem, 1986, 261(2): 576 - 583.
- Papadopoulos V, Amri H, Boujrad N, et al. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis [J]. Steroids, 1997, 62(1): 21 - 28.

- Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells, cross - striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol [J]. Circ Res, 1982, 50(1): 101 - 116.
- Murry C E, Jennings R B, Reimer K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. Circulation, 1986, 74 (5): 1124 - 1136.
- 徐军美, 常业恬, 胡冬煦, 等. K_{ATP} 通道参与介导吸入麻醉药诱导的兔在体心肌预适应 [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13 (10): 589 - 592.
- Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 304 (3): 433 - 435.
- McEnery M W, Snowman A M, Trifiletti R R, et al. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage - dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(8): 3170 - 3174.
- Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition [J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1241(2): 139 - 176.
- Carayon P, Portier M, Dussossoy D, et al. Involvement of peripheral benzodiazepine receptors in the protection of hematopoietic cells against oxygen radical damage [J]. Blood, 1996, 87(8): 3170 - 3178.
- Bono F, Lamarche I, Prabonnaud V, et al. Peripheral benzodiazepine receptor agonists exhibit potent antiapoptotic activities [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 265(2): 457 - 461.
- Kunduzova O R, Escourrou G, De La Farge F, et al. Involvement of peripheral benzodiazepine receptor in the oxidative stress, death - signaling pathways, and renal injury induced by ischemia reperfusion [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15 (8): 2152 - 2160.
- Leducq N, Bono F, Sulpice T, et al. Role of peripheral benzodiazepine receptors in mitochondrial, cellular, and cardiac damage induced by oxidative stress and ischemia - reperfusion [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 306(3): 828 - 837.

(收稿日期: 2007 - 01 - 30)

修回日期: 2007 - 09 - 14)

(本文编辑: 李银平)